مجله میکروب شناسی پزشکی ایران
سال ۲ شماره ۱ بهار ۱۳۸۷، صفحات ۴۵-۵۱

تاثیر پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* بر اتصال استرپتوکوک های دهانی در شرایط آزمایشگاه

آرزو طهمورث پور*[۱] ، روحا کسری کرمانشاهی[۲] ، رسول صالحی[۳] ، عبدالرضا نبی نژاد[۴]

۱) دانشگاه آزاد اسلامی واحد خوراسگان اصفهان
۲) گروه زیست شناسی، دانشگاه الزهرا تهران
۳) گروه زیست شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان
۴) مرکز تحقیقات جهاد کشاورزی
نویسنده رابط: آرزو طهمورث پور، دانشگاه آزاد اسلامی واحد خوراسگان اصفهان
تلفن :۶۲۷۸۳۱۴- ۰۳۱۱ همراه: ۰۹۱۳۳۱۳۰۰۵۲ atahmoures@khuisf.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۸۶/۱۱/۱۴ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۷/۲/۲۲

چکیده:

زمینه و اهداف: استرپتوکوک های دهانی بویژه *استرپتوکوکوس موتانس* از عوامل موثر در ایجاد پوسیدگی دندان و بیماری های پریودنتال شناخته شده اند. با افزایش مقاومت باکتریایی به آنتی بیوتیک ها، برای حذف باکتری های پاتوژن حفره دهانی یک روش جدید، از جمله استفاده از پروبیوتیک ها می تواند مورد بررسی قرار گیرد. به همین منظور در این مطالعه تاثیر *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* به عنوان یک ارگانیسم پروبیوتیک بر فرایند اتصال استرپتوکوک های دهانی به سطوح، مورد بررسی قرار گرفته است.

روش بررسی : سویه استاندارد *استرپتوکوکوس موتانس* ATCC35668 به همراه ۴۰ سویه *استرپتوکوکوس موتانس* وسایر استرپتوکوک های دهانی جداشده از نمونه های پلاک و پوسیدگی افراد داوطلب مورد بررسی قرارگرفت. قدرت تشکیل بیوفیلم در این سویه ها با روش رنگ سنجی ارزیابی گردید و قویترین سویه ها در تشکیل بیوفیلم انتخاب شد. سپس تاثیر سویه پروبیوتیک (*لاکتوباسیلوس فرمنتوم* ATCC9338) بر اتصال استرپتوکوک ها در میکروتیتر پلیت های پلی استیرنی به طور همزمان و ۳۰ دقیقه قبل از ورود استرپتوکوک به سیستم مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: نتایج نشان دهنده کاهش اتصال استرپتوکوک ها در حضور پروبیوتیک مربوطه بود که در زمانی که سویه پروبیوتیک قبل از استرپتوکوک وارد سیستم شده بود کاهش اتصال بیشتر شد. کاهش اتصال احتمالا به دلیل کلونیزه شدن جایگاه های اتصال با سویه پروبیوتیک قبل از ورود سویه استرپتوکوکی و میانکنش بین باکتری ها می باشد.

نتیجه گیری: چون اتصال مهمترین و اولین فاکتور در ایجاد پوسیدگی و بیماری می باشد، کاهش اتصال می تواند راه موثری در کاهش ریسک پوسیدگی دندان باشد.

کلید واژه ها : استرپتوکوک، اتصال، پوسیدگی دندان، پروبیوتیک، *لاکتوباسیلوس فرمنتوم*

مقدمه :

عفونت های دهان معمول ترین و گران ترین اشکال عفونت های انسانی را تشکیل می دهند. پوسیدگی های دندانی و بیماری های پریودنتال در ۹۵٪ افراد جامعه وجود دارد. گرچه فلورایدتراپی و دیگر روش های پیشگیرانه منجر به کاهش قابل توجهی در وقوع پوسیدگی های دندانی شده اند ولی هنوز عفونت به طور واقعی کنترل و محدود نشده است (۱و۲). در پوسیدگی دندان و بیماری های پریودنتال مهمترین عامل اتصال باکتری های دهانی به ویژه استرپتوکوک ها به سطوح مختلف دهان و دندان می باشد. تغییر اکولوژی میکروبی به عنوان یک مکانیسم برای پیشگیری از پوسیدگی دندانی یک مسئله با اهمیت است و از آنجایی که مقاومت باکتری ها به آنتی بیوتیک ها در حال افزایش است، یافتن مواد ضدمیکروبی جدیدتر و بهتر برای پیشگیری و درمان بیماری های دهان و دندان (۳و۴) و بررسی تاثیر این مواد بر اتصال باکتری های دهان به سطوح مختلف ضروری به نظر می رسد.

برای حذف باکتری های پاتوژن حفره دهانی یک روش جدید، از جمله استفاده از پروبیوتیک ها می تواند مورد بررسی قرار گیرد. استفاده از پروبیوتیک ها یک راه امیدبخشی است که برای مبارزه با عفونت ها می توان از باکتری های بی ضرر (مفید) کمک گرفته آنها را جایگزین میکروارگانیسم های پاتوژن نمود (۱).

پروبیوتیک ها معمولاً میکروارگانیسم های غیربیماری زایی هستند که بر سلامتی و فیزیولوژی میزبان تاثیر مثبت دارند. تاکنون این باکتری ها به طور موفقیت آمیز در کنترل بیماری های معده ا ی روده ای مورد استفاده واقع شده اند. به همین دلیل اطلاعات بیشتری در ارتباط با کلونیزاسیون پروبیوتیک ها در دهان و اثر احتمالی آنها بر بیوفیلم های باکتریایی دندان مورد نیاز است. دلایل متعددی وجود دارد که مکانیسم های عمل پروبیوتیک ها در دهان مشابه با عمل آن در دیگر قسمت های دستگاه معده ای ــ روده ای باشد و به دلیل افزایش جهانی مقاومت دارویی میکروارگانیسم ها ضرورت استفاده از پروبیوتیک ها معلوم شده و تحقیقات بیشتری را در این زمینه می طلبد (۵). هدف از این مطالعه بررسی تاثیر لاکتوباسیلوس فرمنتوم به عنوان یک پروبیوتیک بر فرایند اتصال استرپتوکوک های دهانی می باشد.

مواد و روش ها:

سویه های باکتریایی و شرایط رشد:

در این تحقیق ۴۰ سویه باکتریایی از نمونه های پوسیدگی دندان و پلاک دندان افراد داوطلب هر دو جنس با میانگین سن ۲۵ سال و عدم مصرف هرگونه آنتی بیوتیک در یک ماه گذشته، توسط کورت استریل دندانپزشکی جداسازی گردید. سویه استاندارد *استرپتوکوکوس موتانس* با (ATCC 35668) نیز برای مقایسه تهیه گردید. همه سویه ها بر محیط کشت های بلاد آگار و میتیس سالیواریوس آگار ساخت کارخانه مرک آلمان و در اتمسفر حاوی دی اکسید کربن و دمای ۳۷ درجه سانتیگراد کشت و گرمخانه گذاری شد. سپس با کمک تست های بیوشیمیایی و کیت شناسایی سریع RAP ID STR به دو گروه موتانس وسایر استرپتوکوک های دهانی تقسیم گردید.

لاکتوباسیلوس فرمنتوم با ATCC9338 و PTCC1638 از مرکز کلکسیون قارچ ها و باکتری های صنعتی و عفونی ایران تهیه گردید و در محیط کشت MRS آگار کشت و نگهداری گردید.

تشکیل بیوفیلم باکتری ها به روش میکروتیتر پلیت :

برای سنجش قدرت تشکیل بیوفیلم توسط باکتری های جدا شده از سوسپانسیونی معادل با استاندارد ۰/۵ مک فارلند در محیط کشت TSB حاوی ۱ درصد سوکروز استفاده شد. ۲۵۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون به هر چاهک در میکروتیتر پلیت ۹۶ چاهکی پلی استیرن انتقال داده شد. چاهک های شاهد تنها حاوی محیط می باشند. پس از ۲۴ ساعت محتویات چاهک ها خارج و هر چاهک ۳ مرتبه توسط ۳۰۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژی استریل شسته شد. ۲۵۰ میکرولیتر اتانل به مدت ۱۵ دقیقه برای تثبیت باکتری های متصل به دیواره و کف چاهک به کار رفت. پس از خشک شدن چاهک ها پلیت ها به مدت ۵ دقیقه با ۲۰۰ میکرولیتر رنگ کریستال ویوله ۲درصد رنگ آمیزی شدند. سپس سنجش کمی تولید بیوفیلم توسط اضافه کردن ۲۰۰ میکرولیتر اسید استیک ۳۳ درصد به هر چاهک و بررسی جذب نوری رنگ کریستال ویوله موجود در حلال رنگ بر در طول موج ۴۹۲nm توسط دستگاه ELISA READER انجام گرفت. در نهایت کلاس بندی ایزوله ها بر اساس جذب نوری (OD) به صورت زیر صورت گرفت (۶).

OD= میانگین جذب نوری یک باکتری

ODc= میانگین جذب نوری برای چاهک های شاهد

Non Adherent: $OD \leq ODc$
Weakly adherent: $ODc < OD \leq 2OD$
Moderately adherent: $2ODc < OD \leq 4ODc$
Strongly adherent: $4ODc < OD$

سپس سویه های شدیدا چسبنده که قدرت تشکیل بیوفیلم آنها از بقیه بیشتر بود برای مرحله بعد انتخاب شدند.

تاثیر لاکتوباسیلوس فرمنتوم بر اتصال باکتری های با قدرت اتصال بالا:

در این مرحله نیز از روش میکروتیتر پلیت استفاده گردید به این ترتیب که کشت شبانه یک درصد رقیق شده از استرپتوکوک های دهانی با قدرت اتصال بالا در محیط کشت TSB کامل شده با ۱٪ سوکروز و پروبیوتیک مورد نظر (*لاکتوباسیلوس فرمنتوم*) ۱٪ رقیق شده در محیط کشت MRS broth تهیه شد. در روش اول ۲۰۰ میکرولیتر از مخلوط هم حجم از دو محیط فوق به چاهک های میکروتیتر پلیت انتقال داده شد، چاهک های شاهد فقط حاوی سوسپانسیون استرپتوکوک های دهانی بودند. در روش دیگر ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون پروبیوتیک ها وارد چاهک ها شده و ۳۰ دقیقه بعد سوسپانسیون استرپتوکوک ها اضافه گردید. در چاهک های شاهد این مرحله ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر PBS و پس از ۳۰ دقیقه ۱۰۰ میکرولیتر استرپ اضافه شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون محلول ها ومواد غذایی از چاهک ها خارج و ۳ بار شستشو با PBS انجام و با کریستال ویوله ۲٪ به مدت ۵ دقیقه رنگ آمیزی انجام شد و پس از افزودن اسید استیک ۳۳٪ جذب نوری رنگ موجود در حلال رنگ بر توسط دستگاه ELISA READER خوانده شد و با مقایسه با چاهک های شاهد درصد کاهش اتصال باکتری ها از طریق کاهش میزان جذب نوری محاسبه گردید (۷).

آنالیز های آماری:

آنالیز آماری در این تحقیق با استفاده از نرم افزار Excel انجام گردید. بر اساس روش تعیین فاصله اطمینان برآورد برای میانگین تیمارها اقدام به رسم گراف با استفاده از error bar گردید.

یافته ها:

تشکیل بیوفیلم :

قدرت تشکیل بیوفیلم باکتری ها با استفاده از بررسی جذب نوری توسط ELISA READER بررسی شد که یک روش رنگ سنجی می باشد. در این مرحله باکتری های دارای قدرت چسبندگی بیشتر و توانایی بالا در تشکیل بیوفیلم انتخاب گردید. ۳۳ درصد از ایزوله ها شدیدا چسبنده بوده (SA) که قدرت تشکیل بیوفیلم بالایی داشتند که از این بین ۶۷ درصد *استرپتوکوکوس موتانس* و بقیه استرپتوکوک های غیرموتانس بودند. ۳۹ در صد قدرت چسبندگی و تشکیل بیوفیلم متوسط را نشان داده که ۵۴ درصد آن استرپتوکوک موتانس بوده و ۲۵ درصد ایزوله ها نیز قدرت چسبندگی ضعیف داشتند که فقط ۳۰ درصد آن مربوط به استرپتوکوک های موتانس بود و ۳ درصد از باکتری های جدا شده فاقد قدرت چسبندگی و تشکیل بیوفیلم بودند که همگی گونه های دیگر استرپتوکوک بودند (نمودار ۱و۲). سویه استاندارد استرپتوکوکوس موتانس با ATCC35668 نیزبا شماره ۲۴ در این تحقیق بررسی گردید که بر اساس نتایج حاصله، جزء باکتری های شدیدا چسبنده قرارگرفت. آنالیز های آماری اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد را بین سویه های شدیدا چسبنده و دیگر سویه ها نشان داد. بین استرپتوکوک های جداسازی شده که قدرت چسبندگی وتشکیل بیوفیلم بالایی داشتند به جز *استرپتوکوکوس موتانس* جدایه شماره ۲۲ با استرپتوکوک شاهد از نظر اتصال و تشکیل بیوفیلم تفاوت معنی داری دیده نشد. *استرپتوکوکوس موتانس* جدایه ۲۲ بالاترین قدرت چسبندگی وتشکیل بیوفیلم را داشت که از نظر آماری تفاوت معنی دار درسطح ۱ درصد با باکتری شاهد نشان داد.

تاثیر *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* بر اتصال استرپتوکوک ها ی با قدرت اتصال بالا:

استرپتوکوکوس های با قدرت اتصال بالا و همچنین یک استرپتوکوک با قدرت اتصال بسیار ضعیف با استفاده از نتایج مرحله قبل انتخاب گردید و تاثیر *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* با ۲ روش برعلیه اتصال آنها به چاهک های پلی استیرنی میکروتیتر پلیت ارزیابی گردید. در روش اول از مخلوط هم حجم لاکتوباسیل و استرپتوکوک و در روش دوم لاکتوباسیل ۳۰ دقیقه پس از به کاربردن استرپتوکوک استفاده شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون تفاوت جذب نوری چاهک های شاهد (حاوی استرپتوکوک تنها) و چاهک های مورد نظر (حاوی استرپتوکوک ولاکتوباسیل) برای محاسبه تاثیر پروبیوتیک مورد نظر بر اتصال استفاده شد. نتایج نشان دهنده کاهش اتصال در حضور پروبیوتیک مربوطه بود. اتصال استرپتوکوکوس موتانس شاهد (ATCC35668) به چاهک های پلی استیرن در روش های ۱و ۲ درحضور پروبیوتیک به ترتیب ۲۱ درصد و۳۳/۵ درصد کاهش داشت که از نظر آماری این تفاوت معنی دار بود. اتصال *استرپتوکوکوس موتانس* شماره ۲۲ که چسبنده ترین استرپتوکوک جداسازی شده، (با تفاوت معنی دار آماری در سطح۰۰۱ /۰) بود در روش اول ۱۰ و روش دوم ۱۷/۵ درصد کاهش یافت که تفاوت معنی داری از نظر کاهش اتصال بین دو روش مورد استفاده دیده نشد (نمودار ۲ الف).

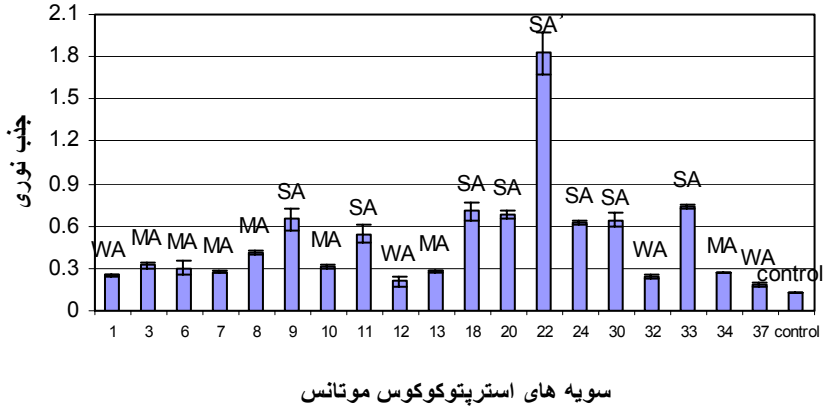
در روش دوم که *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* ۳۰ دقیقه قبل از استرپتوکوک به کار برده شد در اکثر موارد کاهش بیشتری در اتصال

ایجاد شد که میانگین کاهش اتصال در روش های اول و دوم به ترتیب ۱۷،۲۹ و۲۶،۲۳ درصد به دست آمد (نمودار ۳ الف).

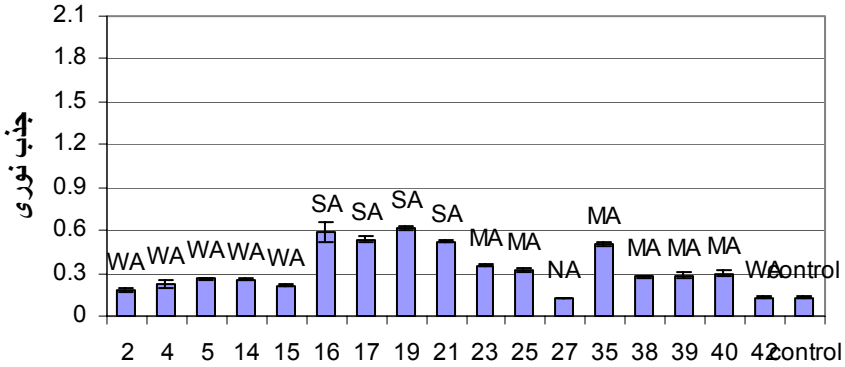
به طور کلی در هر ۲ روش مورد استفاده *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* بر اتصال استرپتوکوک های غیر موتانس تاثیر بیشتری نسبت به استرپتوکوک های موتانس داشت ولی از نظر آماری تفاوت معنی داری دیده نشد. (نمودار ۳ ب).

نمودار ۱: تعیین قدرت تشکیل بیوفیلم الف) استرپتوکوک های موتانس ب) و دیگر استرپتوکوک های دهانی
SA: شدیدا چسبنده ، MA: نسبتا چسبنده ، WA: چسبندگی ضعیف ، NA : بدون قدرت چسبندگی
استرپتوکوکوس موتانس ۲۴ همان سویه استاندارد با ATCC35668 می باشد

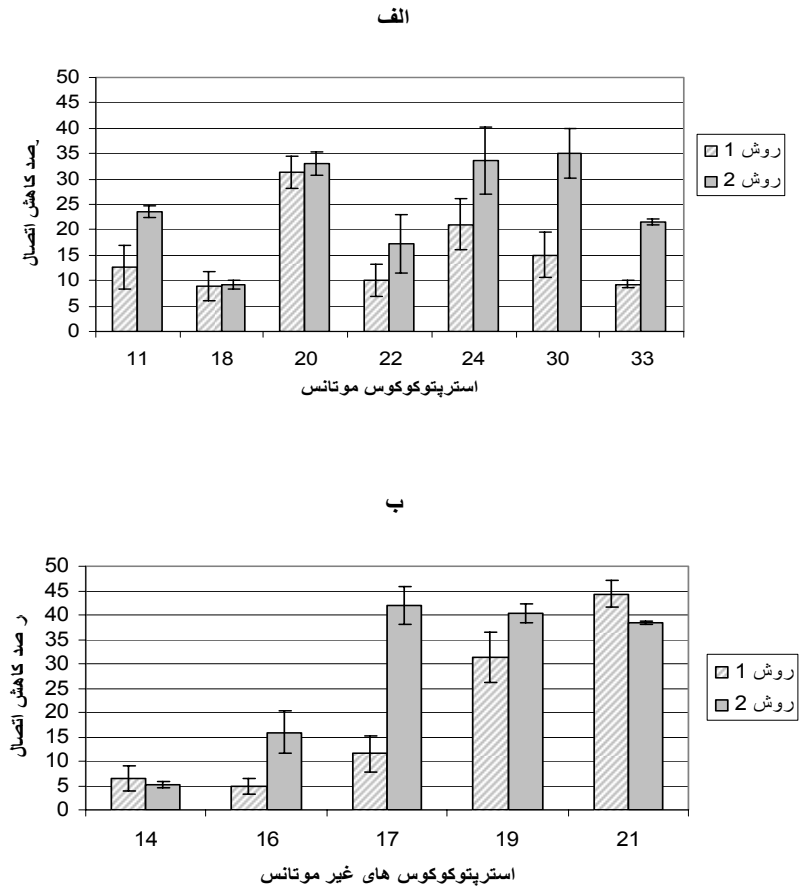
الف



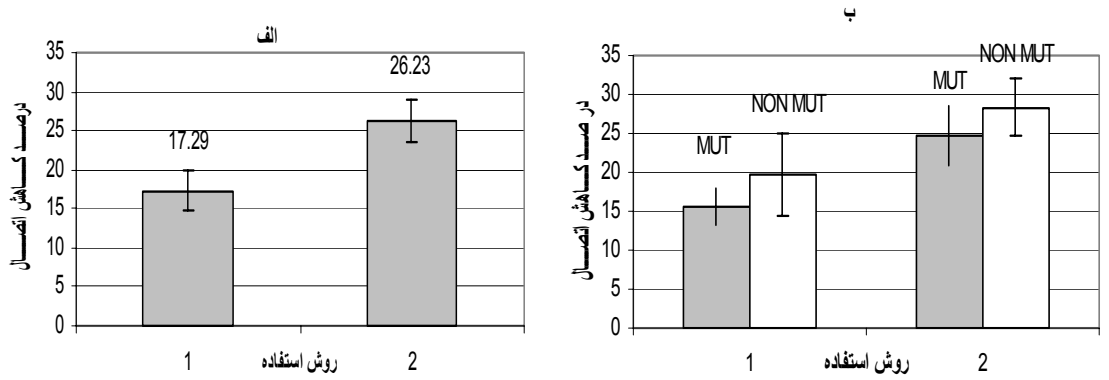
ب



نمودار ۲: تاثیر لاکتوباسیلوس فرمنتوم بر اتصال الف) استرپتوکوک های موتانس ب) غیرموتانس با ۲ روش مورد استفاده



نمودار۳: مقایسه کاهش اتصال ایجاد شده الف) در حضور لاکتوباسیلوس فرمنتوم بین دو روش مورد استفاده ب) و بین استرپتوکوک های موتانس (MUT) ودیگر استرپتوکوک های دهانی (NON MUT) در ۲ روش مورد استفاده



بحث :

بر اساس نتایج حاصله از این تحقیق مشخص شد که حضور *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* ATCC9338 به عنوان یک باکتری پروبیوتیک می تواند باعث کاهش اتصال استرپتوکوک ها به سطوح مورد آزمایش گردد که این مطلب می تواند به میانکنش بین باکتری ها نسبت داده شود. زمانی که سویه پروبیوتیک قبل از استرپتوکوک وارد سیستم مورد آزمایش گردید کاهش اتصال بیشتر شد و از نظر آماری نیز تفاوت معنی داری با استفاده هم زمان هر دو باکتری داشت که نشان می دهد افزودن سویه پروبیوتیک قبل از سویه پوسیدگی زا (کاریوژنیک) کلونیزاسیون آن را در سطوح مورد مطالعه افزایش داده است. از طرفی تصور می شود که سویه پروبیوتیک قادر به تغییر بخشی از ساختمان یا فیزیولوژی باکتری دخیل در تشکیل بیوفیلم (استرپتوکوک های موتانس وسایر گونه های استرپتوکوک دهانی) خواهد بود که این تغییر بویژه در ارتباط با *استرپتوکوکوس موتانس* جدایه ۲۰ و استرپتوکوک غیر موتانس جدایه ۲۱ مشخص می شود که اتصالشان به میزان بیشتری از دیگر جدایه ها تحت تاثیر پروبیوتیک مورد استفاده قرار گرفته و کاهش یافته است. در بیشتر ایزوله ها از جمله *استرپتوکوکوس موتانس* جدایه ۳۰ و استرپتوکوکوس غیر موتانس جدایه ۱۷ و *استرپتوکوکوس موتانس* سویه شاهد با ATCC35668 (ایزوله ۲۴) تفاوت معنی دار آماری از نظر کاهش اتصال در حضور پروبیوتیک در بین ۲ روش مورد استفاده دیده شده که مربوط به پر شدن جایگاه های اتصال توسط سویه پروبیوتیک قبل از ورود سویه کاریوژنیک می باشد. از طرفی *استرپتوکوکوس موتانس* جدایه ۲۲ که بالاترین قدرت اتصال را داشت و در نتیجه پرقدرت ترین و پاتوژن ترین باکتری مورد بررسی در نظر گرفته شد، در مقابل تاثیر پروبیوتیک تاحدی مقاومت نشان داد و کاهش اتصال کمتری یافت و تفاوت معنی داری نیز بین ۲ روش مورد استفاده این باکتری و برخی از دیگر باکتری های مورد مطالعه دیده نشد ولی در هر دو حالت اتصال این باکتری ها به سطوح پلی استیرنی میکروتیتر پلیت ها در حضور پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* با ATCC9338 کاهش یافت که می تواند به میانکنش باکتریایی، رقابت در اتصال به جایگاه های اتصال و یا حتی خاصیت تولید ترکیبات با قدرت ضد اتصالی توسط سویه پروبیوتیک توجیه گردد که باید مورد توجه و بررسی بیشتر قرار گیرد.

در همین راستا کوملی وهمکاران (۲۰۰۲) با مطالعه تاثیر سویه های باکتریایی لبنی (*لاکتوکوکوس لاکتیس* و *استرپتوکوکوس ترموفیلوس*) بر سلامت دهان به این نتیجه دست یافتند که تلقیح سویه های لبنی قبل از سویه های دهانی میزان کلونیزاسیون سویه لبنی را افزایش نداد مگر در برخی موارد. آنها همچنین گزارش کردند که سویه های لبنی بویژه *لاکتوکوکوس لاکتیس* قادر به تغییر بخشی از خصوصیات برخی از باکتری های دهانی به ویژه استرپتوکوک های اورالیس و سوربینوس بودند که تعداد کلونی آنها در حضور پروبیوتیک مورد استفاده به طور معنی داری کاهش نشان داده است(۷) .

میلر و همکاران نیز وقتی تاثیر میانکنش میکروبی را بر تشکیل پلاک *استرپتوکوکوس موتانس* بررسی می کردند نیز به این نتیجه دست یافتند که برخی از باکتری ها از جمله *لاکتوباسیلوس کازئی* (که امروزه به عنوان سویه پروبیوتیک مطرح است) در تشکیل پلاک استرپتوکوکوس موتانس کاهش قابل توجهی ایجاد می کنند و این نتیجه را به میانکنش بین باکتری ها ارتباط داده اند (۸).

نیس و همکاران در سال ۲۰۰۲ تاثیرات مفید مصرف طولانی مدت شیر حاوی پروبیوتیک را بر پوسیدگی های دندانی کودکان ۳ تا ۴ ساله گزارش نمودند. علاوه بر این آنها گزارش کردند که یکی از سویه های لاکتوباسیلوس رامنوزوز (GG) می تواند به عنوان یک سویه پروبیوتیک در کاهش استرپتوکوک های موتانس و سوربینوس به کار رود (۹).

آهولا و همکاران نیز در تحقیق خود مصرف کوتاه مدت محصولات پروبیوتیک را مورد بررسی قرار دادند و در فلور پوسیدگی زا تغییر مشاهده کردند. در مطالعه آن ها تعداد استرپتوکوک های موتانس بزاقی به طور معنی داری نسبت به گروه شاهد کاهش یافته بود که دلیل آن را کلونیزه شدن باکتری های پروبیوتیک در حفره دهانی گزارش نمودند (۱۰).

نیکاوا و همکاران در سال ۲۰۰۴ گزارش کردند که مصرف شیر تخمیر شده (ماست) حاوی *لاکتوباسیلوس روتری* می تواند در کاهش ریسک پوسیدگی دندان موثر واقع گردد (۱۱) .

مطالعات مختلف نشان داده که لاکتوباسیل ها با مهار استرپتوکوک های پاتوژن و کاندیدا در حفره دهان مفید واقع می شوند. *لاکتوباسیلوس رامنوزوز* و *روتری* با کاهش استرپتوکوکوس های موتانس عامل پوسیدگی به عنوان پروبیوتیک قادر به پیشگیری از پوسیدگی می باشند. یکی از مکانیسم های موثر پروبیوتیک ها، میانکنش آنها با باکتری های بیماری زا گزارش شده است (۱۲).

نتیجه گیری:

به طور کلی می توان نتیجه گرفت که پروبیوتیک ها از جمله لاکتوباسیل ها قادر به اتصال به سطوح و تعدیل نمودن جایگزینی گونه های اورال استرپتوکوک ها می باشند و با تاثیر بر فرایند اتصال استرپتوکوک های پوسیدگی زا که اولین و مهم ترین عامل در ایجاد بیماری و پوسیدگی می باشد، قادر به کاهش خطر پوسیدگی دندان و دیگر بیماری های پریودنتال خواهند بود. آیا این الگوی رفتاری در بدن هم چنین نتایجی را به دنبال خواهد داشت ؟ به هر حال تاثیر پروبیوتیک های مختلف بر ریسک فاکتور های پوسیدگی باید مورد توجه و بررسی بیشتری قرار بگیرد. علاوه بر این تاثیر برخی از متابولیت های ثانویه پروبیوتیک ها بر فرایند تشکیل پلاک استرپتوکوک ها از اهمیت خاصی برخوردار خواهد بود که تحت بررسی است و نتایج آن در آینده انتشار خواهد یافت.

فهرست مراجع:

1. Caglar E, Kargul B, Tanbogaet I. Bacteriotherapy and probiotics role on Oral health: *Oral Disease*. 2005; **11**:1-7.
2. Kargul B, Caglar E, Tanbogaet I. (2003). History of water fluoridation. *Journal of clinical pediatric dentistry* 2003; **27**: 213-7.
3. Cudic M. Development of novel antibacterial peptide that kill resistant isolates. *Peptides* 2002; **23**: 2071- 83.
4. Nicolas G, Auger I, Beaudoin M, Halle F, Morency H, leLa Pointe G, et al. Improved methods for mutacin detection and production. *Journal of Microbiological methods* 2004; **59**: 351-61.
5. Meurman JH. Probiotics: do they have a role in oral medicine and dentistry. *Europian Journal of oral Science* 2005; **113**: 188-96.
6. Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I., Savic B. A modified microtiter plate test for quantification of *staphylococcal* biofilm formation. *Journal of microbiology methods* 2004; **40** (2):175-9.
7. Comelli EM, Guggenheim B, Stingele F, Nesser J. Selection of dairy bacterial strains as probiotics for oral health . *Europian journal of Oral sciences* 2002; **110**: 218-24.
8. Miller CH, Kleinman JL. Effect of microbial interactions on in vitro plaque formation by *S.mutans*. *Journal of Dental Research* 1974; **53** (2): 427-34.
9. Nase L, Hatakka K, Savilahti E, Saxelin M, Pönkä A, Poussa T, et al. Effect of long-term consumption of a probiotic bacterium, *lactobacillus rhamnosus* GG.In milk on dental caries and caries risk in children. *Caries Research* 2001; **35**: 412-20.
10. Ahola AJ, Yli- Knuuttila H, Suomalainen T, Poussa T, Ahlstrom A, Meurmanb JH, Korpelaet R. Short term Consumption of probiotic-Containing cheese and effect on dental Caries risk Factors. *Archive Oral Biology* 2002; **47**:799-804.
11. Nikawa H, Makihira S, Fukushima H, Nishimura H. Lactobacillus reuteri in bovine milk fermented decreases the oral carriage of mutans streptococci. *Int J Food microbial* 2004; **95**(2):219-23.
12. Mokeem SA. (2007). The synergism of probiotics in dentistry. *Saudi Dental Journal* 2007; **19** (3):1-3.