Arch

مجله دانشکده علوم پزشکی نیشابور

www.journalnums.ac.ir

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 10:45 IRST on Wednesday January 15th 2020

بررسی فنوتیپی و مولکولی تولید بیوفیلم در *استرپتوکوکوس موتانس* های ایجاد کننده پلاک دندانی

فاطمه قره خانی*، امیرحسین مؤمن

گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد همدان، همدان، ایران

مقاله پژوهشی اصیل

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۱/۲۲

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۴/۱۸

***نویسنده مسئول:** فاطمه قره خانی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده ی علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد همدان، همدان، ایران

تلفن: ۰۹۱۲۰۳۷۷۸۵۹

پست الکترونیک:

mozhgan.gharahkhani@gmail.com

چکیده

مقدمه

پوسیدگی دندان یکی از مهم ترین معضلات پیش روی سلامت عمومی در جوامع مختلف می‌باشد. فعالیت باکتری‌های تولید کننده اسید به ویژه بیوفیلم‌های *استرپتوکوکوس موتانس* اصلی‌ترین عامل ایجاد کننده این عارضه محسوب می‌شود. ایجاد بیوفیلم‌های باکتری مذکور منوط به حضور آنزیمی ویژه به نام گلوکان سوکراز یا گلوکوزیل ترانسفراز است که توسط ژن *gtf* کد می‌شود. هدف از این مطالعه بررسی ژن‌های مؤثر*gtfB* و *gtfC* باکتری *استرپتوکوکوس موتانس* در تشکیل بیوفیلم پلاک دندانی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

برای جداسازی *استرپتوکوکوس موتانس*، از محیط کشت بلاد آگار استفاده شد. به منظور تایید کلنی‌های *استرپتوکوکوس موتانس* آزمون‌های بیوشیمیایی و تخمیرقند انجام شد. در این بررسی بیوفیلم با استفاده از روش پلیت میکروتیتر بر روی سطوح پلی‌استیرنی تشکیل گردید و پس از رنگ آمیزی با کریستال ویوله از طریق دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۵۵۰ نانومتر قرائت گردید. جهت بررسی محصول PCR، نمونه‌ها بر روی ژل آگارز ۱درصد منتقل شد و بعد از رنگ آمیزی در دستگاه ژل داک مورد بررسی قرار گرفت..

یافته‌ها

یافته‌ها نشان داد از ۴۶ نمونه مورد مطالعه ۱۹ جدایه (۴۱/۳۰ درصد) واجد ژن *gtfB* و ۸ مورد (۱۷/۴ درصد) واجد ژن *gtfC* بودند.. در این مطالعه بیشترین میزان رشد باکتری *استرپتوکوکوس موتانس* جداشده از پلاک دندان در غلظت ۰/۵ گرم بر لیتر ساکارز و ۴/۵ pH= حاصل شد.

نتیجه‌گیری

بنابراین قند ساکارز که قند معمول موجود در رژیم غذایی است سبب رشد باکتری *استرپتوکوکوس موتانس*، که عامل اصلی پوسیدگی دندان است، می‌شود.

کلیدواژه‌ها

استرپتوکوکوس موتانس، بیوفیلم، پوسیدگی دندان، PCR

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 10:45 IRST on Wednesday January 15th 2020

مقدمه

پوسیدگی دندان یکی از مهم ترین معضلات پیش روی سلامت عمومی در جوامع مختلف به ویژه کشورهای توسعه نیافته و درعین حال جزو بیماری‌های شایع در کشورهای توسعه یافته نیز می‌باشد. این بیماری عارضه‌ای چند عاملی و مهم است که بخش عظیمی از پژوهش‌های حوزه‌ی سلامت عمومی به ویژه تحقیقات میکروب شناسی را به خود اختصاص می‌دهد. با وجود اثر گذاری عوامل مختلف در ایجاد و پیشرفت پوسیدگی دندان اما فعالیت باکتری‌های تولیدکننده اسید به‌ویژه بیوفیلم‌های *استرپتوکوکوس موتانس*[1] اصلی ترین عامل ایجاد کننده ی این عارضه محسوب می‌شود (۱، ۲).

استرپتوکوکوس موتانس باکتری کروی شکل، گرم مثبت، بی‌هوازی اختیاری، فاقد قدرت حرکت و دارای قابلیت متابولیزه کردن قندهای مختلف به ویژه سوکروز می‌باشد. این باکتری با متابولیزه کردن قندهای موجود در محیط اطرافش اسید تولید نموده که در نهایت موجب حل شدن مینای دندان‌ها و ظهور حالت پوسیده آن‌ها می‌شود (۳). بیوفیلم کمپلکسی مرکب از میکروارگانیسم‌هایی است که به یکدیگر در روی سطحی متصل شده‌اند. تشکیل بیوفیلم نیاز به اتصال اولیه باکتری‌ها به یک سطح دارد و ازدیاد جمعی باکتریایی به دنبال آن رخ می‌دهد. میکروارگانیسم‌هایی که بیوفیلم را تشکیل می‌دهند عمدتا *استرپتوکوکوس موتانس* و باکتری‌های بی‌هوازی با ترکیبی که در نقاط مختلف دهان متفاوت است می‌باشند. ایجاد بیوفیلم‌های باکتری مذکور منوط به حضور آنزیمی ویژه به نام گلوکان سوکراز یا گلوکوزیل ترانسفراز است. این آنزیم عضوی از خانواده آنزیمی گلیکوزید هیدرولازها موسوم به GH70 می‌باشد. این آنزیم دارای تعداد اسید آمینه‌های مختلفی در سویه‌های مختلف می‌باشد اما به طور میانگین دارای ۱۷۰۰-۱۱۰۰ اسیدآمینه بوده و توسط ژن *gtf* کد می‌شوند (۴، ۵). گلوکان سوکراز با اتصال واحدهای گلوکز از طریق پیوندهای مختلف از نوع آلفا موجب سنتز یک هموپلیمر ویژه موسوم به گلوکان می‌شود. ترشح این هموپلی ساکارید چسبناک توسط *استرپتوکوکوس موتانس* موجب شکل گیری بیوفیلم‌های این باکتری و اتصال محکم آن‌ها به سطح دندان می‌شود. *استرپتوکوکوس موتانس* به طور معمول دارای سه نوع آنزیم گلوکان سوکراز است که *gtfB*، *gtfC* و *gtfD* نامیده می‌شوند. این سه آنزیم توسط ژن‌هایی با همین نام کد شده که نوع B و D به ترتیب با اتصال واحدهای قندی ازطریق پیوندهای آلفا (۳→۱) و آلفا (۶→۱) انواع محلول و غیر محلول هموپلی ساکارید گلوکان را سنتز می‌کنند اما نوع C آنزیم گلوکان سوکراز هر دو نوع محلول و غیر محلول گلوکان را سنتز می‌کند (۶، ۷). عوامل محیطی و فردی مانند رژیم غذایی، قرارگیری در معرض فلوراید، بهداشت دهان، جریان بزاق و عوامل ایمنی می‌توانند بر روی توزیع میکروفلور دهانی و ایجاد پوسیدگی دندانی تأثیر بگذارند (۸). میزان بالای *استرپتوکوکوس موتانس* حفره دهان، فرد را در گروه پرخطر برای ابتلا به پلاک دندان قرار می‌دهد که این گروه‌ها براساس میزان *استرپتوکوکوس موتانس* در هر کشور و هر نژادی متفاوت است. همچنین ژن‌های مختلفی در ایجاد بیوفیلم پلاک دندانی در این باکتری نقش دارند. از این رو این مطالعه برای اولین بار در شهر همدان به بررسی ژن‌های مؤثر *gtfB/C* باکتری *استرپتوکوکوس موتانس* در تشکیل بیوفیلم پلاک دندانی می‌پردازد.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه‌ها

[1] *Streptococcus mutans*

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 10:45 IRST on Wednesday January 15th 2020

در این مطالعه تجربی سوآپ نمونه‌های پلاک دندانی افرادی که طی مدت ۳ ماه به کلینیک دندان‌پزشکی سیب (پاستور شهر همدان) مراجعه نمودند، جمع آوری شد. سپس، سوآپ‌ها در محیط نگهدارنده‌ی تایوگلیکولات (شرکت مرک آلمان) قرار گرفت و بلافاصله به آزمایشگاه انتقال یافت. برای جداسازی *استرپتوکوکوس موتانس*، از محیط کشت بلاد آگار استفاده شد و نمونه‌ها بعد از کشت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شد.

تست‌های تشخیصی باکتری *استرپتوکوکوس موتانس*

به منظور تایید کلنی‌های مشکوک به *استرپتوکوکوس موتانس*، از کلنی‌های تشکیل شده بر روی محیط کشت، لام میکروسکوپی تهیه و رنگ آمیزی گرم انجام شد. با مشاهده کوکسی‌های گرم مثبت، آزمون‌های بیوشیمیایی کاتالاز، اکسیداز و تخمیر قندهای مانوز، سوربیتول، سالیسین، تره‌هالوز، لاکتوز و مانیتول بر روی سویه‌های جداشده انجام و باکتری تعیین هویت شد. آزمون‌های مانیتول، لاکتوز، سالیسین و تره‌هالوز *استرپتوکوکوس موتانس* مثبت بودند، اما آزمون‌های مانوز، کاتالاز و اکسیداز منفی بودند (۹، ۱۰).

تشکیل بیوفیلم

سوش استاندارد باکتری *استرپتوکوکوس موتانس* با PTCC ۳۵۶۶۸ از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران به صورت لیوفلیزه تهیه گردید. جهت تهیه‌ی سوسپانسیون میکروبی معادل $1/5\times10^8$ CFU/ml کشت ۲۴ ساعته باکتری بر روی بلاد آگار انجام شد و سپس سوسپانسیونی با کدورت ۰/۵ مک فارلند در نرمال سالین تهیه گشت.

به منظور بررسی تشکیل بیوفیلم کلنی‌های باکتری *استرپتوکوکوس موتانس* جداشده از پلاک‌های دندانی بیماران از پلیت ۹۶ خانه پلی‌استیرن استفاده شد، ابتدا باکتری‌ها را طبق استاندارد نیم مک فارلند تهیه نموده، سپس از محیط BHI مایع به همراه ساکاروز ۲ درصد و باکتری به چاهک‌ها تلقیح شد و در انکوباتور ۳۷ درجه به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شد. برای کنترل منفی از محیط‌های تازه و برای کنترل مثبت از سویه ۳۵۶۸۸ PTCC/*استرپتوکوکوس موتانس* بیوفیلم مثبت استفاده شد. بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون، جهت خارج ساختن سلول‌های منفرد همه‌ی چاهک‌ها به آرامی تخلیه و جهت تثبیت بیوفیلم باکتری، متانول خالص به میزان ۲۰۰ میکرولیتر به مدت ۱۰ دقیقه به چاهک‌ها اضافه شده و در دمای اتاق قرارگرفت. بعد از تخلیه، ۲۰۰ میکرولیتر رنگ کریستال ویوله ۱ درصد افزوده شده و به مدت ۲۰ دقیقه در مجاورت این رنگ و دمای اتاق قرار گرفت. بعد از تخلیه رنگ و شستشو با آب مقطر، ۲۰۰ میکرولیتر اسید استیک گلاسیال ۳۳ درصد را به آن اضافه نموده و جذب همه‌ی چاهک‌ها با دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۵۵۰ نانومتر، قرائت شد (۱۱).

استخراج DNA

جهت استخراج DNA از کیت باکتری‌های گرم مثبت سیناژن (Cinna Pure DNA KIT-PR881614) استفاده شد.

برنامه آزمون PCR: مرحله دناتوراسیون اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، مرحله‌ی دناتوراسیون ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، مرحله اتصال ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، مرحله بسط ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه (تعداد ۴۰ چرخه) و مرحله بسط نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه بود. مشخصات پرایمرهای عمومی (NCBI) مورد استفاده در جدول (۱) ذکر شده است (۱۲).

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 10:45 IRST on Wednesday January 15th 2020

جدول ۱- مشخصات پرایمرها برای انجام واکنش PCR باکتری *استرپتوکوکوس موتانس*

پرایمر	توالی '۵ به '۳	طول باند محصول
GtfB-F	ACT ACA CTT TCG GGT GGC TTG G	۵۱۷ bp
GtfB-R	CAG TAT AAG CGC CAG TTT CAT C	۵۱۷ bp
GtfC-F	CTC AAC CAA CCG CCA CTG TT	۲۰۶ bp
GtfC-R	GGT TTA ACG TCA AAA TTA GCT GTA TTA GC	۲۰۶ bp

مراحل PCR

میکروتیوب‌های استریل واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز[۱] با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر با استفاده از نسبت مواد واکنش ذکر شده در جدول ۲ تهیه گردید (۱۲). آزمون PCR توسط دستگاه ترموسایکلر مدل BIORAD انجام شد. از سوش استاندارد باکتری *استرپتوکوکوس موتانس* با PTCC ۳۵۶۸۸ (سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران) به عنوان کنترل مثبت و از آب مقطر به عنوان کنترل منفی استفاده شد. جهت بررسی محصول PCR، نمونه‌ها بر روی ژل آگارز ۱درصد انتقال می‌یابند و بعد از رنگ آمیزی در دستگاه ژل داک مدل BIORAD مورد بررسی قرارگرفت.

جدول ۲- نسبت‌های تهیه شده برای انجام PCR باکتری *استرپتوکوکوس موتانس*

ماده	مقادیر (میکرولیتر)
پرایمر Forward	۱/۵
پرایمر Reverse	۱/۵
DNA	۲/۵
Master mix	۱۲/۵
آب مقطر سترون	۷
حجم نهایی	۲۵

[۱] Polymerase Chain Reaction (PCR)

تعیین مواد و عوامل مؤثر در رشد باکتری *استرپتوکوکوس موتانس*

- اثر منبع کربن

باکتری *استرپتوکوکوس موتانس* (سویه‌ای که بیشترین میزان OD در تشکیل بیوفیلم داشت) در شرایط استریل در محیط کشت مایع BHI (Merk آلمان) حاوی غلظت‌های مختلف قند ساکارز: غلظت‌های صفر (به‌عنوان شاهد)، ۰/۱۲۵، ۰/۲۵ و ۰/۵ گرم بر لیتر کشت داده شد و تاثیر غلظت‌های ساکاروز بر روی رشد این باکتری مورد مطالعه قرار گرفت. پس از گذشت ۲۴ ساعت کدورت سنجی در طول موج ۶۳۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر انجام گرفت.

- ترسیم منحنی رشد

پس از کشت باکتری در محیط نوترینت مایع در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، با اندازه گیری جذب نوری در طول موج ۶۳۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (UV-Visible) در هر ۴ ساعت یک بار بعد از کشت اندازه گیری و منحنی رشد سویه جداسازی شده رسم گردید.

- تعیین pH بهینه رشد

به منظور تعیین pH بهینه رشد باکتری جداسازی شده، از محیط کشت نوترینت مایع با دامنه‌های pH مختلف (۴/۵،

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 10:45 IRST on Wednesday January 15th 2020

۶، ۷ و ۸) استفاده گردید. پس از گذشت ۲۴ ساعت کدورت سنجی در طول موج ۶۳۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر انجام گرفت.

داده‌های آماری با استفاده از نسخه ۲۴ نرم افزار SPSS و آزمون آماری t مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها

نتایج این مطالعه نشان داد باکتری *استرپتوکوکوس موتانس* با (۷۵/۴۱ درصد) ۴۶ مورد مهم‌ترین عامل پوسیدگی دندان به‌شمار می‌رود. همچنین تعداد *استرپتوکوکوس موتانس* شناسایی شده در این مطالعه در مردان (۶۷/۴ درصد) ۳۱ مورد و زنان (۳۲/۶ درصد) ۱۵ مورد بود. توزیع سنی افراد مورد مطالعه در جدول ۳ نشان داده شده است.

جدول ۳- نتایج توزیع سنی بیماران

میانگین سنی	درصد فراوانی
۷-۱۰	۱/۶۴
۱۱-۲۰	۶/۵۶
۲۱-۳۰	۱۸/۰۳
۳۱-۴۰	۲۷/۲۸
۴۱-۵۰	۱۴/۱۱
۵۱-۶۰	۱۹/۶۷
۶۱-۷۰	۶/۵۶

پس از *استرپتوکوکوس موتانس*، باکتری‌های جنس *لاکتوباسیلوس*[1] با (۱۸/۰۳ درصد) و سایر گونه‌های باکتریایی که شامل باکتری‌های گرم مثبتی مانند *اکتینومایستال*[2] و ... با (۶/۵۶ درصد) عوامل بعدی موثر در ایجاد پلاک دندان محسوب می‌شوند (جدول ۴).

جدول ۴- فراوانی و درصد گونه‌های مختلف باکتریایی عامل پلاک دندان

نوع باکتری	*استرپتوکوکوس موتانس*	*لاکتوباسیلوس*	دیگر گونه‌ها	مجموع
فراوانی	۴۶	۱۱	۴	۶۱
درصد	۷۵/۴۱	۱۸/۰۳	۶/۵۶	۱۰۰

نتایج تشکیل بیوفیلم

تولید بیوفیلم در پلیت میکروتیتر توسط باکتری‌ها نشان داد باکتری شماره ۱۹ با میزان جذب نوری ۱/۴۳ بیشترین میزان تولید بیوفیلم را دارا می‌باشد (نمودار ۱).

بر اساس نتایج جدول ۵ آنالیز واریانس و همچنین آزمون Tukey انجام گرفته میزان P-value برای تشکیل بیوفیلم باکتری *استرپتوکوکوس موتانس* با روش میکروتیتر برابر ۰/۰۰۰ می‌باشد. به بیان دیگر میانگین جذب ۴۶ باکتری مورد بررسی در مقایسه با نمونه کنترل متفاوت می‌باشد و از نظر آماری معنی‌دار است ($p< ۰/۰۵$).

نتایج PCR

بر اساس نتیجه آزمایش PCR جهت شناسایی و تعیین ژن *gtfB/C* مشخص گردید که از ۴۶ ایزوله مورد مطالعه تنها ۱۹ جدایه (۴۱/۳۰ درصد) واجد ژن *gtfB* و ۸ مورد (۱۷/۴ درصد) واجد ژن *gtfC* بودند. شکل (۱) نتیجه آزمون PCR نمونه‌های مثبت از نظر حضور ژن‌های *gtfB/C* را نشان می‌دهد. طول قطعه DNA تکثیر شده برای ژن gtfB، bp ۵۱۷ و برای ژن gtfC، bp ۲۰۶ بود (شکل ۲).

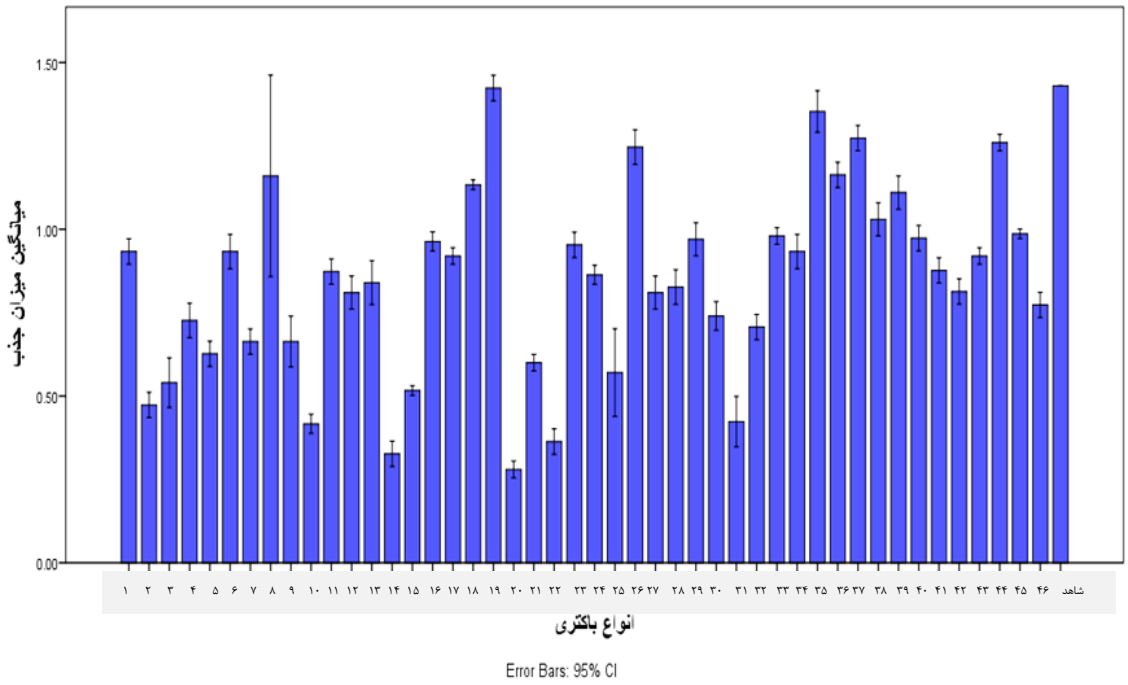
[1] *Lactobacillus*

[2] *Actinomycetales*

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 10:45 IRST on Wednesday January 15th 2020



نمودار ۱- نتایج تشکیل بیوفیلم باکتری‌ها به صورت جذب نوری در طول موج ۵۵۰ نانومتر

جدول ۵- آنالیز واریانس ANOVA مقدار جذب

غلظت‌های مختلف	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	آماره F	سطح معناداری
بین گروهی	۱۶۶۸۱/۱۳۴	۴۵	۳۷۰/۶۹۲	۳/۴۳۸	۰/۰۰۰
درون گروهی	۹۹۲۰/۲۷۱	۹۲	۱۰۷/۸۲۹	-	-
مجموع	۲۶۶۰۱/۴۰۶	۱۳۷	-	-	-

شکل۱- نتایج PCR مربوط به ژن *gtfB*. از سمت چپ L نشانگر ۱۰۰ bp، C^+: کنترل مثبت (*استرپتوکوکوس موتانس* PTCC ۳۵۶۸۸)، C^-: کنترل منفی (آب مقطر)، نمونه‌های ۳، ۵، ۹ و ۱۰ از نظر وجود ژن *gtfB* با طول باند ۵۱۷ bp مثبت می‌باشند.

www.SID.ir

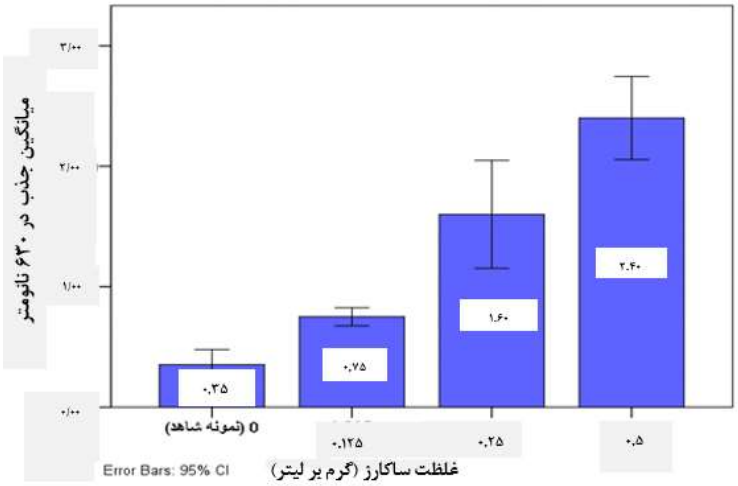
Archive of SID

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 10:45 IRST on Wednesday January 15th 2020

شکل۲- نتایج PCR مربوط به ژن *gtfC* از سمت چپ L نشانگر ۱۰۰ bp، چاهک C^+ کنترل مثبت ، چاهک C^- کنترل منفی، چاهک‌های ۴ و ۵ از نظر وجود ژن *gtfC* با طول باند ۲۰۶ bp مثبت می‌باشند.

اثر غلظت‌های مختلف ساکارز

با افزایش غلظت ساکارز در محیط، رشد باکتری نسبت به نمونه شاهد افزایش یافت. به‌طوری که بیشترین میزان رشد، در بالاترین غلظت ساکارز مورد استفاده مشاهده گردید (نمودار ۲). طبق آزمون آماری Tukey مقایسات چندگانه (جدول ۶)، افزایش رشد باکتری در غلظت‌های بیشتر ساکارز در مقایسه با گروه کنترل از نظر آماری معنی‌دار است ($p< ۰/۰۵$).



نمودار ۲- اثر غلظت‌های مختلف ساکارز بر رشد باکتری *استرپتوکوکوس موتانس*

www.SID.ir

Archive of SID

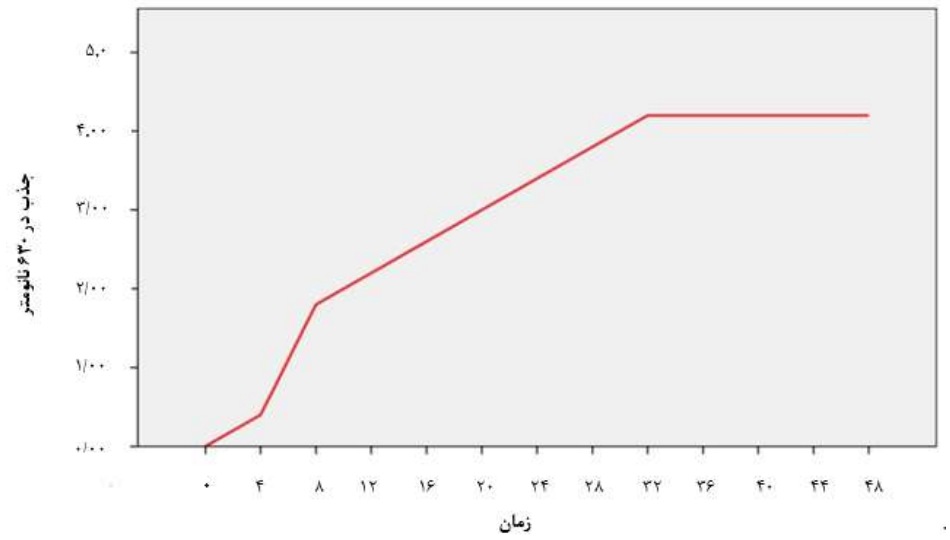
Downloaded from journal.nums.ac.ir at 10:45 IRST on Wednesday January 15th 2020

جدول ۶- جدول مقایسات چندگانه Tukey

غلظت ساکارز (گرم بر لیتر)	غلظت ساکارز (گرم بر لیتر)	اختلاف میانگین	انحراف معیار	p-value	فاصله اطمینان ۹۵ درصد	
					کران پایین	کران بالا
(نمونه شاهد)	۰/۱۲۵	- ۰/۳۹۶۶۷	۰/۰۹۵۸۶	۰/۰۱۴	۰/۷۰۳۶	- ۰/۸۹۷
	۰/۲۵	- ۱/۲۴۶۶۷	۰/۰۹۵۸۶	۰/۰۰۰	-۱/۵۵۳۶	- ۰/۹۳۹۷
	۰/۵	- ۲/۰۴۶۶۷	۰/۰۹۵۸۶	۰/۰۰۰	- ۲/۳۵۳۶	- ۱/۷۳۹۷
۰/۱۲۵	(نمونه شاهد)	۰/۳۹۶۶۷	۰/۰۹۵۸۶	۰/۰۱۴	۰/۰۸۹۷	۰/۷۰۳۶
	۰/۲۵	- ۰/۸۵۰۰۰	۰/۰۹۵۸۶	۰/۰۰۰	۰/۱۵۷۰	۰/۵۴۳۰
	۰/۵	- ۱/۶۵۰۰۰	۰/۰۹۵۸۶	۰/۰۰۰	۱/۹۵۷۰	- ۱/۳۴۳۰
۰/۲۵	(نمونه شاهد)	۱/۲۴۶۶۷	۰/۰۹۵۸۶	۰/۰۰۰	۰/۹۳۹۷	- ۱/۵۵۳۶
	۰/۱۲۵	۰/۸۵۰۰۰	۰/۰۹۵۸۶	۰/۰۰۰	۰/۵۴۳۰	۱/۱۵۷۰
	۰/۵	- ۰/۸۰۰۰۰	۰/۰۹۵۸۶	۰/۰۰۰	- ۱/۱۰۷۰	۰/۴۹۳۰
۰/۵	(نمونه شاهد)	۲/۰۴۶۶۷	۰/۰۹۵۸۶	۰/۰۰۰	۱/۷۳۷۹	۲/۳۵۳۶
	۰/۱۲۵	۱/۶۵۰۰۰	۰/۰۹۵۸۶	۰/۰۰۰	۱/۳۴۳۰	۰/۹۵۷۰
	۰/۲۵	۰/۸۰۰۰۰	۰/۰۹۵۸۶	۰/۰۰۰	۰/۴۹۳۰	۱/۱۰۷۰

منحنی رشد

همان طور که در نمودار ۳ مشاهده می‌شود، سویه *استرپتوکوکوس موتانس* جداسازی شده در ساعت‌های ابتدایی رشد و حدود ۴ ساعت پس از کشت به فاز لگاریتمی رسید. سویه مورد بررسی پس از ۲۴ ساعت با پایان فاز لگاریتمی وارد فاز رکود گردید.



نمودار ۳- منحنی رشد سویه *استرپتوکوکوس موتانس*

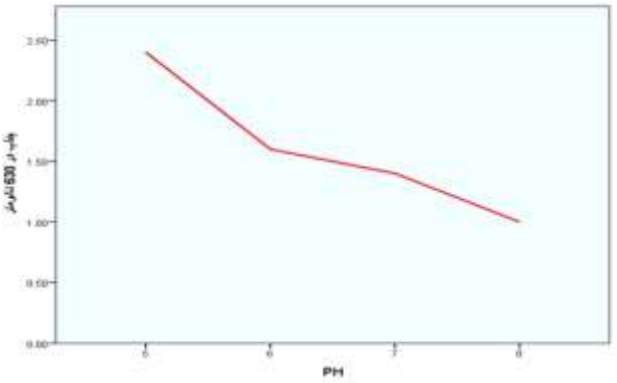
www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 10:45 IRST on Wednesday January 15th 2020

نتایج pH بهینه

نتایج به دست آمده نشان داد که سویه *استرپتوکوکوس موتانس* در pH ۴/۵ بیشترین میزان رشد را دارد اما با افزایش pH رشد آن نیز کاهش می‌یابد (نمودار ۴).



نمودار۴- منحنی pH بهینه رشد باکتری *استرپتوکوکوس‌موتانس*

بنابراین کاهش pH حفره دهان سبب ایجاد شرایط مؤثر جهت افزایش فعالیت *استرپتوکوکوس موتانس* و تشکیل پلاک دندان و افزایش پوسیدگی دندان می‌گردد.

بحث

در این مطالعه بیوفیلم با استفاده از روش پلیت میکروتیتر بر روی سطوح پلی استیرنی تشکیل گردید و پس از رنگ آمیزی با کریستال ویوله از طریق دستگاه الایزا ریدر قرائت گردید. نتایج نشان داد میزان جذب نوری بیوفیلم تولیدی توسط نمونه‌های *استرپتوکوکوس موتانس*جداشده از بیماران با یکدیگر متفاوت بوده و بیشترین میزان جذب مربوط به باکتری *استرپتوکوکوس موتانس* شماره ۱۹ به مقدار ۱/۴۳ می‌باشد. در ایران مطالعات زیادی برای شناسایی مولکولی ژن حدت *gtfB* و *gtfC* در باکتری *استرپتوکوکوس موتانس* با استفاده از PCR صورت نگرفته است. لذا در این مطالعه به نقش ژن‌های مذکور در ایجاد پوسیدگی‌های دندان در سنین مختلف اشاره شده است (جدول ۳).

ژن‌های *gtf* در فرآیند تولید پلیمرهای گلوکان و اتصال باکتری به سطوح دارای اهمیت زیادی می‌باشند. افزایش مقدار بیان آن‌ها در حالت بیوفیلم نسبت به فرم پلانکتونی این موضوع را تایید می‌کند. یوشیدا و همکاران در مطالعه‌ای نشان دادند که میزان بیان ژن *gtfB* در حالت بیوفیلم چهار برابر نسبت به حالت پلانکتونیک افزایش می‌یابد (۱۳). بررسی‌ها دیگر نشان می‌دهد که این ژن از نظر انتشار عوامل حدت و ایجاد پلاک دارای فراوانی‌های متفاوت می‌باشد.

در تحقیق حاضر از روش PCR جهت شناسایی ژن‌های *gtfB/C استرپتوکوکوس موتانس* استفاده شد. به‌طوری که از ۴۶ نمونه مورد مطالعه ۱۹ جدایه (۴۱/۳۰ درصد) واجد ژن *gtfB* و ۸ مورد (۱۷/۴ درصد) واجد ژن *gtfC* بودند.

صالحی و همکارانش با جستجوی ژن‌های موتاسین در *استرپتوکوکوس موتانس* ایزوله شده از بیماران ایرانی و با استفاده از روش PCR دریافتند که شاید موتاسین *استرپتوکوکوس موتانس‌دارای* خاصیت آنتاگونیستی در مقابل رشد دیگر باکتری‌ها می‌باشند (۱۴).

قاسم پور و همکاران در سال ۲۰۱۳ با بررسی روی کودکان ۶-۴ ساله اعلام نمودند که فراوانی بیوفیلم پلاک دندانی تشکیل شده توسط *استرپتوکوکوس موتانس*، به مراتب بیشتر از استرپتوکوکوس سوبرینوس[1] بود از (در حدود ۶۵ ادرصد) و در کودکان ناقل ۷۵/۶ درصد جداسازی شد (۱۵).

سلطان دلال و همکاران با بررسی نقش*استرپتوکوکوس موتانس* به عنوان پاتوژن اصلی پوسیدگی در کودکان ۳-۵ سال حساس و مقاوم به پوسیدگی دندان دریافتند که میزان جداسازی *استرپتوکوکوس موتانس* با سن بیمار و میزان مصرف مواد قندی بطور کامل مرتبط است و موجب افزایش

[1] *streptococcus sobrinus*

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 10:45 IRST on Wednesday January 15th 2020

ابتلا به این باکتری و کلونیزاسیون آن می‌گردد (۱۶). در مطالعه حاضر تعداد *استرپتوکوکوس موتانس* شناسایی شده در مردان (۶۷/۴ درصد) ۳۱ مورد و زنان (۳۲/۶ درصد) ۱۵ مورد بود.

نتایج به دست آمده با روش PCR در این مطالعه با مطالعات محققین دیگر در نقاط مختلف دنیا تفاوت‌هایی دارد که این اختلاف ممکن است به علت تفاوت‌های فرهنگی در استفاده از مسواک و نخ دندان، نوع رژیم غذایی و وضعیت بهداشت دهان و دندان باشد (۱۶).

مطالعه بوزیک و همکاران نشان داده است که مقدار و ماهیت منبع کربن، نقش مهمی در رشد و تولید آنزیم‌های خارج سلولی ایفا می‌نماید (۱۷). در مطالعه حاضر تاثیر منبع کربن (ساکارز) بر میزان رشد باکتری *استرپتوکوکوس موتانس* در چهار غلظت مختلف بررسی گردید که نتایج نشان داد با افزایش غلظت ساکارز میزان رشد باکتری به صورت کدورت در محیط کشت مایع افزایش می‌یابد و سبب افزایش جذب در طول موج ۶۳۰ نانومتر گردید. از آنجا که ساکارز سوبسترای آنزیم گلوکوزیل ترانسفراز می‌باشد می‌توان گفت که افزایش غلظت ساکارز در محیط سبب افزایش فعالیت این آنزیم می‌گردد.

رشد و بقا میکروارگانیسم‌ها تا حد زیادی تحت تاثیر pH محیط قرار می‌گیرد. میکروارگانیسم‌ها از نظر pH مورد نیازشان با هم تفاوت دارند. به‌طوری که در مطالعه حاضر نیز کاهش pH محیط کشت سبب افزایش رشد باکتری *استرپتوکوکوس موتانس* گردید. در این مطالعه میزان رشد باکتری در چهار سطح pH اندازه گیری شد که نتایج نشان داد بیشترین رشد باکتری در pH اسیدی ۴/۵ بود و با افزایش pH محیط میزان رشد باکتری نیز کاهش یافت.

نتیجه‌گیری

بطور کلی در راه پیشرفت‌های جدید برای شناخت کامل پوسیدگی‌های دندانی و محو کامل آن‌ها یافتن راهکارهای جدیدی برای کاهش موارد پلاک‌های دندانی و عوامل ایجاد کننده آن‌ها ضرورت دارد. پیشنهاد می‌گردد که به بررسی مواد ضد میکروبی بر ماده بیوفیلم متشکل از انواع استرپتوکوک‌های دهانی به منظور کاهش پوسیدگی و پروفایل آنتی‌بیوتیکی این باکتری، هرساله انجام شود تا شیوه درمانی مناسب ارائه گردد. همچنین پیشنهاد می‌شود بتوان با استفاده از پروبیوتیک‌ها به طور انتخابی باکتری‌های عامل پوسیدگی دندان را مهار و فلور میکروبی دهان را تعدیل کرد. از جمله محدودیت‌های این مطالعه عدم همکاری در جمع‌آوری نمونه و عدم همکاری بیمارستان‌ها و مراکز دندانپزشکی بود.

References

1. Forssten SD, M. Björklund and Ouwehand AC. *Streptococcus mutans*, caries and simulation models. Nutrients 2010; 2(3): 290-8.
2. Loesche, WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. Microbiol rev 1986; 50(4): 353.
3. Nishimura J, Saito T, Yoneyama H, Bai LL, Okumura K, Isogaie E. Biofilm formation by *Streptococcus mutans* and related bacteria. Advances in Microbiology 2012; 2(3):208-15.
4. Irague R, Tarquis L, André I, Moulis C, Morel S, Monsan P, *et al*. Combinatorial engineering of dextransucrase specificity. PloS One 2013; 8(10): e77837.
5. Ito K, Ito S, Shimamura T, Weyand S, Kawarasaki Y, Misaka T, *et al*. Crystal structure of glucansucrase from the dental caries pathogen *Streptococcus mutans*. J Mol Biol 2011. 408(2):177-86.
6. Banas JA. Virulence properties of *Streptococcus mutans*. Front Biosci 2004; 9(10):1267-77.

www.SID.ir

Archive of SID

7. Monchois V, Willemot RM, and Monsan P. Glucansucrases: mechanism of action and structure–function relationships. FEMS Microbiol Rev 1999; 23(2):131-51.
8. Batoni G, Pardini M, Giannotti A, Ota F, Giuca MR, Gabriele M, *et al*. Effect of removable orthodontic appliances on oral colonisation by mutans streptococci in children. Eur J Oral Sci 2001;109(6): 388-92.
9. Facklam R. What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. Clin Microbiol Rev 2002;15(4): 613-30.
10. Novak J, Caufield PW, Miller EJ. Isolation and biochemical characterization of a novel lantibiotic mutacin from *Streptococcus mutans*. J Bacteriol 1994; 176(14): 4316-20.
11. Fujiwara T, Hoshino T, Ooshima T, Hamada S. Differential and quantitative analyses of mRNA expression of glucosyltransferases from *Streptococcus mutans* MT8148. J Dent Res 2002; 81(2):109-13.
12. Oho T, Yamashita Y, Shimazaki Y, Kushiyama M, Koga T. Simple and rapid detection of Streptococcus mutans and Streptococcus sobrinus in human saliva by polymerase chain reaction. Oral Microbiol Immunol 2000; 15(4): 258-62.
13. Yoshida A, Kuramitsu H. *Streptococcus mutans* biofilm formation: utilization of a gtfB promoter-green fluorescent protein (PgtfB::gfp) construct to monitor development. Microbiology 2002; 148(Pt 11): 3385-94.
14. Salehi M, Moradi S, Aghili T, Razavipor R. Exploration of mutacin genes I/III and II in *Streptococcus mutans* isolated from Iranian patients. Medical Sciences 2011; 21(2): 89-96. [Persian]
15. Mowlana Z, Ghasem Pour, Asghar Pour P, Elmi M, Baghban Shaker P. The frequency of *Streptococcus Mutans* and *Lactobacillus* spp. in 3-5-year- old children with and without dental caries. mljgoums 2013;7(1):29-34.
16. Soltan Dallal MM, Dargahi H, Mehrani F, Sharifi Yazdi MK, Rahimi Forushani A, Miremadi A. The role of *streptococcus mutants* in dental caries in two groups of sensitive and resistance children age between 3 to 5 years. Payavard 2013; 6(6): 467-77. [Persian]
17. Bozic N, Ruiz2 J, Santin Jl, Vujcic Z. Optimization of the growth and α-amylase production of *Bacillus subtilis* IP 5832 in shake flask and laboratory fermenter batch cultures. J Serb Chem Soc 2011; 76(7): 965-72.

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 10:45 IRST on Wednesday January 15th 2020

www.SID.ir

Archiv

Journal of Neyshabur University of Medical Sciences

www.journalnums.ac.ir

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 10:45 IRST on Wednesday January 15th 2020

Evaluation of phenotypic and molecular analysis of biofilm production in *streptococcus mutants* producing dental plaque

Fatemeh Gharekhani *, Amirhossein Momen

Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Hamedan Branch, Islamic Azad University, Hamedan, Iran

Original Article

Received: 11 Apr, 2019
Accepted: 09 Jul, 2019

***Corresponding Author:**
Fatemeh Gharekhani,
Department of Microbiology,
School of Basic Sciences,
Hamedan Branch, Islamic
Azad University, Hamedan,
Iran
TEL: +98 9120377859
Email:
mozhgan.gharahkhani@gmail.com

ABSTRACT

Introduction
Tooth decay is one of the most important problems facing general health in different societies, the activity of acid-producing bacteria, especially *streptococcus mutant*s, is the main cause of this complication. The creation of the biofilms of the bacterium is subject to the presence of a specific enzyme called glucan sucrase or glucosyltransferase, coded by *gtf* gene. The aim of this study was to evaluate the genes of *GtfB* and *GtfC* of *streptococcus mutant*s in the formation of dental plaque biofilm.

Materials and Methods
Blood agar was used to isolate *streptococcus mutant*s.,. In this study, the biofilm was formed on a polystyrene surface using a microtiter plate and stained with a crystal violet through an ELISA reader at a wavelength of 550 nm. In order to confirm *streptococcus mutant*s colonies, biochemical and fermentative tests were performed., the samples were transferred to 1% agarose gel and examined after dye gel staining.

Results
The results showed that out of 46 samples, 19 isolates (41.30%) had *gtfB* gene and 8 (17.4%) had *gtfC* gene. In this study, the highest growth rate of *streptococcus mutant*s isolated from tooth plaque was obtained at a concentration of 0.5 g / L sucrose and pH = 4.5.

Conclusion
Therefore, sucrose sugar, which is commonly found in the diet, causes the growth of *streptococcus mutant*s, which is the main cause of dental caries.

Keywords
*streptococcus mutant*s, Biofilm, PCR, Tooth Decay

► ***Please cite this article as:*** Gharekhani F, Momen AH. Evaluation of phenotypic and molecular analysis of biofilm production in streptococcus mutants producing dental plaque. J Neyshabur Univ Med Sci 2019;7(3):63-74.

www.SID.ir