ORIGINAL ARTICLE

Effect of Isolated Specific Lytic Phage against Growth and Biofilm Inhibition of Streptococcus mutans and *Streptococcus sanguinis Isolated from Decayed Dental Plaque*

Zahra Rajabi[1,2],
MohammadReza Afradi[3,2],
Donya Alinejhad[4],
Yousef Erfani[5]

[1] PhD in Microbiology, Zoonoses Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[2] Food Microbiology Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[3] Msc in Food Microbiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[4] Assistant Professor, Department of Pediatric Dentistry, Tehran University of Medical Sciences ,Tehran, Iran
[5] Associate Professor, Department of Medical Laboratory, School of Allied Medical Sciences, Tehran University of Medical Science ,Tehran, Iran

(Received February 19, 2022 ; Accepted October 30, 2022)

Abstract

Background and purpose: Despite advances in oral health and dental industry, tooth decay remains one of the most common oral diseases. One of the new methods to combat dental plaque, which is the main cause of caries, is using specific lytic bacteriophage. This study aimed to investigate the effect of isolated specific lytic phage against growth and biofilm inhibition *of Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* isolated from decayed dental plaque samples.

Materials and methods: In this descriptive cross-sectional study, dental plaque samples were cultured in MSA-specific medium to isolate *S. mutans* and *S. sanguinis*. Suspicious isolates were examined by biochemical tests and finally confirmed molecularly by PCR. The ability to form biofilm was measured by crystal violet colorimetry on a microtiter plate. Lytic bacteriophage was isolated from urban raw sewage using double layer agar method and phage morphology was examined by TEM electron microscopy. The effect of lytic phage on the growth of *S. mutans* and *S. sanguinis* was measured by agar spot and well diffusion and its inhibition effect on biofilm was assayed by microtiter plate method.

Results: Out of 150 plaque samples, *S. mutans* and *S. sanguinis* strains were isolated from 65 (43.33%) and 40 (26.67%) samples, respectively. *S. mutans* isolates showed stronger biofilm formation (OD= 0.43). The results of TEM showed lytic bacteriophage belonging to *Siphoviridae* family with a good inhibitory effect on the growth of *S. mutans* and *S. sanguinis* that was able to inhibit biofilm formation up to 96%.

Conclusion: Due to the small size of the phage particles that can have good penetration power to enter the biofilm layers, it can be concluded that the phage has the ability to fight dental plaque.

Keywords: dental plaque, *S. mutans*, *S. sanguinis*, bacteriophage, biofilm

J Mazandaran Univ Med Sci 2023; 32 (216): 76-87 (Persian).

Corresponding Author: Yousef Erfani - School of Allied Medical Sciences, Tehran University of Medical Science , Tehran, Iran. (E-mail: yerfani@tums.ac.ir)

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-25]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره سی و دوم شماره 216 دی سال 1401 (87-76)

بررسی اثر فاژ لیتیک اختصاصی جدا شده بر رشد و مهار تشکیل بیوفیلم *S.mutans* و *S.sanguinis* جدا شده از پلاک دندان پوسیده

زهرا رجبی[1و2]
محمد رضا افرادی[2و3]
دنیا علی نژاد[4]
یوسف عرفانی[5]

چکیده

سابقه و هدف: با وجود پیشرفت در صنعت بهداشت دهان و دندان، مشکل پوسیدگی دندان به عنوان یکی از شایع‌ترین بیماری‌های دهان به قوت خود باقی است. یکی از روش‌های جدید مبارزه با پلاک دندان که عامل اصلی پوسیدگی است، استفاده از باکتریوفاژ لیتیک خاص است. از این رو هدف مطالعه حاضر بررسی تأثیر فاژ لیتیک اختصاصی بر رشد و مهار بیوفیلم *S. mutans* و *S. sanguinis* جدا شده از پلاک دندانی پوسیده بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مقطعی- توصیفی نمونه‌های پلاک دندان جهت جداسازی *S. mutans* و *S.sanguinis* جمع‌آوری و کشت در محیط MSA صورت پذیرفت. جدایه‌های مشکوک با تست‌های بیوشیمیایی بررسی و در نهایت با PCR تایید شدند. توانایی تشکیل بیوفیلم با رنگ‌سنجی کریستال ویوله در پلیت میکروتیتر سنجیده شد. باکتریوفاژ لیتیک با روش double layer agar از فاضلاب خام شهری جداسازی و مورفولوژی فاژ با میکروسکوپ الکترونی TEM بررسی شد. اثر فاژ لیتیک بر رشد *S.mutans* و *S. sanguinis* به روش لکه‌گذاری در آگار و انتشار در چاهک و بر مهار بیوفیلم سنجیده شد.

یافته‌ها: از 150 پلاک مورد بررسی، 65 جدایه (43/33درصد) *S. mutans* و 40 مورد (26/67درصد) *S. sanguinis* جداسازی شد. جدایه‌های *S. mutans* (*OD*=0/43)، بیوفیلم قوی تری به نمایش گذاشتند. نتایج بررسی TEM، باکتریوفاژ لیتیک متعلق به خانواده *Siphoviridae* را نشان داد که اثر مهاری خوبی بر رشد *S. mutans* و *S. sanguinis* داشت و تا 96 درصد قادر به مهار تشکیل بیوفیلم بود.

استنتاج: باتوجه به اندازه ریز ذرات فاژ که می‌توانند قدرت نفوذ خوبی برای ورود به لایه‌های بیوفیلم داشته باشند، می‌توان به توانایی فاژ به عنوان روشی برای مبارزه با پلاک دندان اشاره نمود.

واژه های کلیدی: پلاک دندان، *S. mutans*، *S. sanguinis*، باکتریوفاژ، بیوفیلم

مقدمه

پوسیدگی دندان یکی از شایع‌ترین بیماری‌های دهان و دندان است که تقریبا افراد با گروه‌های سنی مختلف را درگیر می‌کند. بار اقتصادی و هزینه‌های هنگفت درمانی، پوسیدگی را به یکی از معضل‌های اساسی تبدیل نموده است که به دنبال عدم درمان، ازبین رفتن بخشی از دندان و یا حتی کل دندان رخ می‌دهد(1).

مولف مسئول: یوسف عرفانی - تهران: دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پیراپزشکی E-mail: yerfani@tums.ac.ir
1. دکتری میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات بیماری‌های مشترک انسان و دام (زئونوز)، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
2. مرکز تحقیقات میکروبیولوژی مواد غذایی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
3. کارشناس ارشد میکروب شناسی مواد غذایی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
4. استادیار، گروه دندانپزشکی اطفال، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
5. دانشیار، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
تاریخ دریافت : 1400/11/30 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : 1401/1/23 تاریخ تصویب : 1401/8/8

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-25]

پوسیدگی دندانی یک بیماری مزمن و چندعاملی می‌باشد که به واسطه دمینرالیزاسیون دندان ایجاد می‌گردد. یکی از عوامل اصلی ایجاد کننده پوسیدگی، بیوفیلم میکروبی است که توسط باکتری‌های فلور موجود در دهان و دندان و قندهای رژیم خوراکی بر سطح مینای دندان شروع می‌شود. *استرپتوکوک ویریدانس*، یک گروه ناهمگن از استرپتوکوک‌های آلفا همولیتیک، بخشی از فلور طبیعی دهان است که معمولاً مسئول پوسیدگی دندان، پریکورونیت و هم‌چنین اندوکاردیت عفونی تحت حاد است(2).

استرپتوکوکوس موتانس (*Streptococcus mutans*) *S. mutans* برای اولین بار از آسیب پوسیدگی دندان در سال1924 توسط Clarke جدا شد و به عنوان اولین و اصلی‌ترین شروع‌کننده‌ها و مستقر شونده‌ها در ایجاد بیوفیلم پلاک دندانی و شروع پوسیدگی شناخته می‌شوند و همراه با *Streptococcus sobrinus* نقش اساسی در پوسیدگی دارند. به غیر از گروه موتانس، *استرپتوکوکوس سنگوئینیس* (*Streptococcus sanguinis*) *S. sanguinis* از گروه *sanguinis* هم در تشکیل پلاک دندان و ایجاد پوسیدگی نقش بسیار مهمی دارند. این ارگانیسم‌ها قادرند از قندهای موجود در رژیم غذایی مانند سوکروز، فروکتوز و گلوکز استفاده و تولید پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی (EPS) نمایند. تولید مقادیر زیاد EPS، یکی از عوامل اصلی ایجادکننده تشکیل بیوفیلم می‌باشند، که به دنبال تشکیل بیوفیلم تولید اسید توسط باکتری‌های به دام افتاده داخل بیوفیلم جهت رقابت برای مواد غذایی، صورت گرفته و حل شدن هیدروکسی آپاتیت مینای دندان و ایجاد پوسیدگی را به همراه خواهد داشت(3). از آن‌جا که کشور ما ایران در زمره کشورهایی است که خطر پوسیدگی زودرس در کودکان وجود دارد و هم‌چنین آمار پوسیدگی بالایی در آن وجود دارد، به کار بردن رویکردهای جدیدی که بتوان برای مقابله با پوسیدگی‌های دندانی از آن‌ها استفاده نمود ضروری به نظر می‌رسد. درمان‌های آنتی‌بیوتیکی به دلیل افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی زنگ خطری برای مبارزه با بیوفیلم به شمار می‌رود(4). فاژ درمانی روشی جایگزین برای حل این معضل و از بین بردن باکتری مورد نظر می‌باشد. فاژ درمانی به عنوان یکی از هفت روش برای دستیابی به یک رویکرد هماهنگ برای مقابله با تهدیدات مقاومت‌های ضد باکتریایی در یک گزارش توسط موسسه ملی آلرژی و بیماری‌های عفونی در سال 2014 ارائه شد. این نشان دهنده اهمیت فاژ درمانی به عنوان یک ابزار مستند برای مبارزه علیه باکتری مقاوم می باشد. با این وجود موفقیت فاژ درمانی وابسته به توانایی غلبه بر محدودیت‌های استفاده از آن‌ها به عنوان عامل درمانی می‌باشد(5).

در سال‌های 1915و 1917 دو دانشمند به نام‌های Frederick Twort و Félix d'Hérelle درضمن آزمایش‌های خود به طور اتفاقی به وجود این فاژها پی بردند. باکتریوفاژها (فاژها) ویروس‌هائی هستند که فقط باکتری را آلوده می‌کنند. تقریبا 50 برابر کوچک‌تر از باکتری هستند (200-20نانومتر) و در همه جا حاضر می‌باشند(6). دو، چرخه زندگی لیتیک (lytic) و معتدل (temperate) را دارند که در شکل عملکرد با هم متفاوت می‌باشند و در حالت لیتیک می‌توان از آن‌ها به عنوان گزینه‌های درمانی بهره برد. فاژهای لیتیک برای ساختن ژنوم و پروتئین‌های ساختاری بلافاصله درون میزبان تکثیر می‌یابد و درون سلول میزبان ویریون‌های جدید ساخته می‌شود. سرانجام فاژهای جدید با پاره کردن دیواره سلولی آزاد می‌گردند و سبب مرگ سلول میزبان (باکتری) می‌گردد(7). فاژها بدون این‌که برروی فلور طبیعی اثر بگذارند سلول باکتری هدف را آلوده می‌کنند و به‌طور طبیعی با ریشه‌کن کردن سلول باکتری از بدن حذف می‌گردند(8). بیش‌تر فاژها نه تنها اختصاصی عمل می‌کنند بلکه اختصاصی سویه هم می‌باشند(9). زمانی که فاژها از راه درون عروقی تجویز شده‌اند سریعا از سیستم گردش خون پاکسازی شده و به‌طور غالب در طحال و کبد ذخیره

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-25]

شده است. بیش‌تر شواهد پیشنهاد می‌دهد که پروتئین‌های سر باکتریوفاژها با گیرنده‌های مشخصی بر روی سلول‌های ایمنی واکنش داده و سبب تولید سایتوکاین‌ها و پاسخ ایمنی هومورال می‌شود و تا زمانی که فاژ پاکسازی نشود پاسخ ایمنی سلولی هم وارد عمل می‌شود(10). فاژها به دلیل اندازه شان می‌توانند قدرت نفوذ خیلی خوب و موثری را به درون بافت بیوفیلم داشته باشند، بنابراین به منظور رویکرد مقابله با پلاک دندان، هدف از این مطالعه بررسی اثر باکتریوفاژ لیتیک اختصاصی بر تشکیل بیوفیلم توسط *S . mutans* و *S. sanguinis* بود.

مواد و روش ها

جداسازی، شناسایی اولیه و تایید مولکولی S. mutans، S. sanguinis از پلاک دندان

در این مطالعه مقطعی- توصیفی نمونه‌های پلاک دندان، توسط دندانپزشک ازپلاک دندان‌های پوسیده مراجعه کنندگان به درمانگاه دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران (امیر آباد) گرفته و در(PBS:Phosphate Buffer Salin-) (مرک -آلمان) با شرایط مناسب سرمایی به آزمایشگاه منتقل شدند. به منظور دسترسی به کلونی‌های *S. mutans* و *S. sanguinis* کشت بر روی محیط اختصاصی Mitis-Salivarius Agar یا MSA (کیولب - کانادا) صورت گرفت و پس از مشاهده کلونی‌های مشکوک خالص سازی شدند. به منظور تایید بیوتیپی از تست‌های تخمیر کربوهیدارت، تست هیدرولیز آرژنین و همچنین بررسی آنزیم اوره‌آز استفاده گردید. شرایط انکوباسیون 24-48 ساعت در دمای 37 درجه سانتی گراد با شرایط 5% CO_2 انجام پذیرفت(11).

شناسایی مولکولی جدایه‌های S. mutans,S. sanguinis

- استخراج DNA

استخراج DNA از جدایه‌هایی که به صورت فنوتیپی تایید شده بودند با روش جوشاندن (بویلینگ) در دستگاه ترموبلاک BIOER انجام پذیرفت. جهت سنجش غلظت مناسب DNA به دست آمده، از دستگاه نانودراپ Thermo استفاده گردید(12). برای تایید مولکولی جدایه‌های *S.mutans* و *S. sanguinis*، پرایمرهای ژن *gtfP* و *gtfD* که اختصاصی *S. mutans* و *S. sanguinis* بودند از مقاله معتبر، انتخاب و جهت ساخت به شرکت پویاگستر برای ارسال به آلمان فرستاده شد. ویژگی پرایمرهای مورد مطالعه در جدول شماره 1 آورده شده است.

جدول شماره 1: ویژگی پرایمرهای مورد مطالعه

رفرنس	PCR Product (bp)	Primer Sequence(5´-3´)	Target Gene
12	431	F: _GGCACCACAACATTGGGAAGCTCAGTT- R:_GGAATGGCCGCTAAGTCAACAGGAT-	*gtfD*
2	313	F: - GGATAGTGGCTCAGGGCAGCCAGTT- R: -GAACAGTTGCTGGACTTGCTTGTC_	*gtfP*

مراحل در دستگاه ترموسایکلر PeQlab مدل peQSTAR انجام پذیرفت و ردیابی محصول PCR با توجه به اندازه ژن‌ها با الکتروفورز بر روی آگارز 1 درصد و با بافر TBE 0/5 X ، با ولتاژ 103 ولت و زمان حدود 37 دقیقه صورت پذیرفت. در پایان توسط دستگاه ژل داک، تصویر ژل تهیه شد. جهت بهینه نمودن شرایط PCR در حجم 20 میکرولیتر انجام پذیرفت.

بررسی تشکیل بیوفیلم توسط S.mutans و S. sanguinisus جدا شده از پلاک دندان

به منظور بررسی تشکیل بیوفیلم از روش کار جعفری و همکاران در سال 2015 استفاده شد. به‌طور خلاصه در پلیت 96 خانه پلی‌استیرن ابتدا 200 ماکرولیتر از TSB به همراه سوکروز2 درصد که حاوی کدورت نیم مک فارلند ($1/5\times10^8$) از باکتری مورد نظر به صورت جداگانه بودند به چاهک‌ها تلقیح و به مدت 48 ساعت در انکوباتور 37 درجه سانتی گراد قرار داده شدند. در مراحل بعد پس از شست و شوی پلیت‌ها برای تثبیت بیوفیلم باکتری از اتانول 96 درصد به میزان 200 ماکرولیتر و در مرحله رنگ‌آمیزی از رنگ کریستال ویوله 1 درصد و در آخر اسید استیک گلایسیال استفاده

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-25]

و جذب همه چاهک‌ها در 550 نانومتر قرائت شد. از *S. mutants* ATCC *35866* به‌عنوان کنترل مثبت و از رنگ کریستال ویوله و محیط کشت TSB به‌عنوان کنترل منفی استفاده گردید. شکل‌گیری بیوفیلم توسط فرمول‌های زیر طبقه‌بندی شده است: اگر (جذب نوری) OD<ODc بیوفیلم تشکیل نشده باشد (منفی)، اگر ODc<OD<2xODc بیوفیلم ضعیف، اگر 2xODc<OD<4xODc بیوفیلم متوسط و اگر xODc<OD4 بیوفیلم قوی خواهد بود(13).

جداسازی باکتریوفاژ از نمونه فاضلاب

برای جداسازی باکتریوفاژ، فاضلاب خام شهری تهیه گردید. به مدت یک شبانه روز در دمای 4 درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس 6 میلی‌لیتر از فاضلاب به مدت 10 دقیقه دردور 6000g سانتریفیوژ و مایع رویی از یک فیلتر غشایی با اندازه 0/22 میکرومتر عبور داده شد. به منظور غنی‌سازی باکتریوفاژ به محلول صاف شده یک حجم یکسان از محیط BHI (مرک، آلمان) شامل *S. mutans, S. sanguinis* با کدورت نیم مک‌فارلند اضافه شد. یک شبانه روز در دمای 37 درجه انکوباسیون صورت پذیرفت. سانتریفوژ مجدد کشت مایع در دور6000g به مدت 10 دقیقه انجام و مایع رویی از یک فیلتر غشایی با اندازه 0/22 میکرومتر عبور داده شد. برای تایید حضور فاژلیتیک در مایع صاف شده از روش Double layer استفاده شد. بدین منظور100 میکرولیتر از مایع صاف شده با 400 میکرولیتر از کشت باکتری (با کدورت نیم مک فارلند) به مدت 30 دقیقه در دمای 37 درجه سانتی گراد قرار داده شد. سپس به 4/5 میلی‌لیتر از محیط BHI آگار ذوب شده که تا دمای 50 درجه خنک گردیده، اضافه شد و گرماگذاری در دمای 37 درجه سانتی‌گراد به مدت یک شبانه روز (به منظور تشکیل پلاک برروی پلیت که نشانه وجود باکتریوفاژ لیتیک می‌باشد) انجام شد. این مراحل آنقدر تکرار گردید تا بتوان پلاک‌های لیتیک واضح و خوبی در پلیت مشاهده شود. خالص‌سازی باکتریوفاژ با ریختن SM بافر و تکرار مراحل بالا به منظور به‌دست آوردن پلاک‌های یکدست و یکسان از فاژ صورت پذیرفت(14).

تعیین مورفولوژی باکتریوفاژ

باکتریوفاژ جدا شده به لحاظ اندازه و شکل ظاهری با استفاده از میکروسکوپ الکترونی TEM دانشکده فنی دانشگاه خواجه نصیرالدین طوسی بررسی شد. بدین منظور از گرید مسی پوشیده شده با کربن استفاده شد. یک قطره نمونه فاژ را بر روی آن ریخته و سپس با استفاده از اورانیل استات 2 درصد رنگ‌آمیزی شد و توسط میکروسکوپ TEM Zeiss-EM10C-100 KV. دیده شد.

تعیین میزبان و اختصاصیت باکتریوفاژ

برای تعیین میزبان و اختصاصیت باکتریوفاژ از روش *spot test* استفاده شد. برای این منظور جدایه‌های *S. mutans* و *S. sanguinis* از پلاک دندان، *Enterococcus faecalis* ATCC29212، *group A Streptococci*(*Streptococcus pyogen* ATCC 12384)، *group B Streptococci* (*Streptococcus agalactiae* ATCC 12386)، *Staphylococcus aureus 25923* انتخاب شدند. هر گونه باکتری یک شبانه روز در محیط BHI مایع رشد داده شد تا در فاز لگاریتمی قرار گرفت. 100 میکرولیتر از هر کدام کشت باکتری ها را با 4 میلی لیتر از BHI 0/7 درصد خوب مخلوط کرده و سپس با آن سطح BHI آگار 1/5 درصد را پوشانده، پس از سفت شدن و بسته شدن محیط 10 میکرولیتر از باکتریوفاژ درسطح آگار ریخته شد، به طوری که سر سمپلر به سطح آگار تماس پیدا نکرد و یک شبانه روز در 37 درجه گرماگذاری شد. حساسیت به باکتریوفاژ به‌وسیله هاله شفاف مشخص گردید(15).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-25]

اثر مهاری فاژ بر رشد و مهار تشکیل بیوفیلم

برای بررسی اثر فاژ بر مهار رشد از دو روش لکه‌گذاری در آگار (Agar Spot) و روش انتشار در چاهک (Well Diffiusion) استفاده گردید. در هر دو روش ابتدا به صورت چمنی از کدورت معادل نیم مک فارلند *S. mutans* و *S. sanguinis* به صورت جداگانه بر روی محیط BHI آگار کشت داده شد و در یک پلیت 10 ماکرولیتر از باکتریوفاژ به صورت لکه در مرکز پلیت قرار داده شد و در پلیت دیگر ابتدا به کمک انتهای پیپت پاستور استریل چاهک ایجاد کرده و 100 ماکرولیتر از کشت تازه حاوی کدورت نیم مک‌فارلند *S. mutans* و *S. sanguinis* ریخته وسپس به مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد با شرایط 5% CO_2 انجام پذیرفت و قطر هاله عدم رشد به دست آمده بررسی شد.

از کشت شبانه *S. mutans*,*S. sanguinis* در محیط TSB حاوی 2 درصد سوکروز، کدورتی معادل استاندارد 0/5 مک فارلند تهیه شد. سپس 100 ماکرولیتر از سوسپانسیون باکتری با 50 ماکرولیتر از باکتریوفاژ در چاهک میکروتیترپلیت ریخته شد و به مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد در شرایط 5% CO_2 گرماگذاری شد. بعد از گرماگذاری چاهک‌ها سه بار با سرم فیزیولوژی استریل شسته شده و سپس خشک شدند. هر چاهک با 200 ماکرولیتر کریستال ویوله 1 درصد رنگ‌آمیزی گردید و در انکوباتور 37 درجه سانتی گراد با دور 120rpm به مدت 15 دقیقه گرماگذاری شد. OD هر چاهک در 550 نانومتر توسط دستگاه الایزا ریدر خوانده شد(15). میزان درصد کاهش بیوفیلم هم با توجه به فرمول زیر محاسبه گردید(16). هر آزمون سه بار تکرار پذیرفت.

$$\left[\frac{(C-B)-(T-B)}{(C-B)}\right]\times 100$$

C = چاهک کنترل مثبت OD

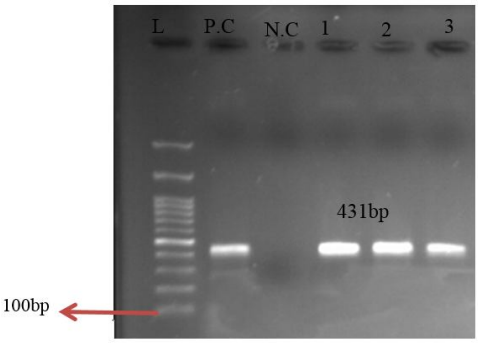
B = کنترل منفی OD

T = چاهک نمونه مورد آزمون

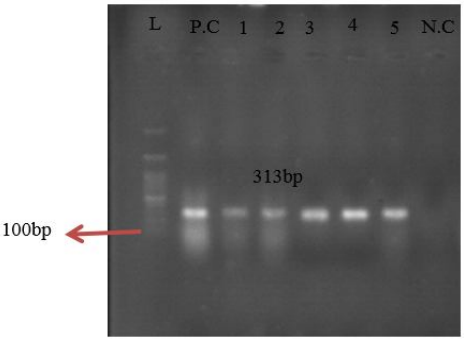
یافته ها

نتایج جداسازی S. mutans و S. sanguinis از پلاک دندان

از کشت 150 نمونه پلاک دندانی، کلنی‌های رنگ پریده آبی مشکوک به *S. mutans* و کلنی‌های سورمه‌ای رنگ حاشیه مضرسی مشکوک به *S. sanguinis* در نظر گرفته شدند. 65 جدایه (43/33 درصد) *S. mutans*، و 40 جدایه (26/67 درصد) *S. sanguinis* جداسازی شد. نتایج بررسی حضور ژن‌های اختصاصی برای تایید مولکولی جدایه‌های به دست آمده به شرح تصویر شماره 1 و 2 است:



تصویر شماره 1: نتیجه الکتروفورز ژن *gtfD*، اندازه باند 431 bp،
L : Ladder 100 bp،
P.C : کنترل مثبت سویه *S. mutans* ATCC35668،
N.C : کنترل منفی (آب، پرایمرهای ژن *gtfD*، Mastermix)
۱،۲،۳: نمونه‌های مورد بررسی حاوی ژن موردنظر



تصویر شماره 2: نتیجه الکتروفورز ژن *gtfD*، اندازه باند 313 bp،
L : Ladder 100 bp،
P.C : کنترل مثبت سویه *S. mutans* ATCC10556،
N.C : کنترل منفی (آب، پرایمرهای ژن *gtfD*، Mastermix)
۱،۲،۳،۴،۵: نمونه‌های مورد بررسی حاوی ژن موردنظر

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-25]

نتایج توانایی تشکیل بیوفیلم توسط سویه‌های S. mutans، S. sanguinis

به منظور بررسی تشکیل بیوفیلم توسط *S. mutans* و *S. sanguinis* پس از گرماگذاری، کدورت معادل استاندارد نیم مک‌فارلند باکتری در محیط TSB به همراه سوکروز2 درصد و شست و شوی و سپس رنگ‌آمیزی با کریستال ویوله و جذب نوری در 550 نانومتر انجام گرفت، که جدایه‌های به‌دست آمده طیف متفاوتی از بیوفیلم قوی تا ضعیف را به نمایش گذاشتند، ولی در این میان جدایه‌های *S. mutans*، بیوفیلم قوی‌تر را به نمایش گذاشتند. *S. mutans*: 10 مورد (15/38 درصد) بیوفیلم ضعیف، 45 مورد (69/23 درصد) بیوفیلم متوسط و 10 مورد (15/38 درصد) بیوفیلم قوی و در مورد *S. sanguinis*: 3 مورد (7/5 درصد) فاقد بیوفیلم، 12 مورد (30 درصد) بیوفیلم ضعیف، 20 مورد (50 درصد) بیوفیلم متوسط و 5 مورد (12/5 درصد) بیوفیلم قوی ایجاد نمودند.

نتیجه جداسازی باکتریوفاژ لیتیک علیه S. mutans و S. sanguinis

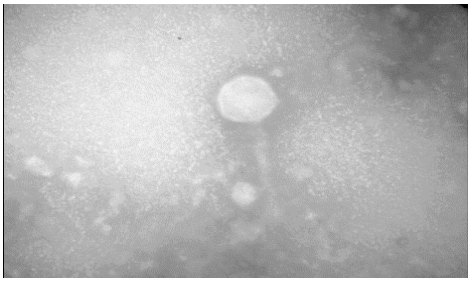
برای جداسازی باکتریوفاژ لیتیک مشاهده پلاک لیتیک باید صورت بگیرد. پس از جدا کردن اولیه باکتریوفاژ، به منظور خالص‌سازی آن یک پلاک از پلیت اولیه حاوی باکتریوفاژ با یک آنس استریل بریده و به کشت مایع 24 ساعته *S. mutans* و *S. sanguinis* اضافه شد و در نهایت به روش Double-layer agar پلاک گرفته شده و با استفاده از SM بافر پلاک ایجاد شده را از پلیت جداسازی شده و خالص گردید(تصویر شماره3).

نتیجه تعیین مورفولوژی باکتریوفاژ

نتایج حاصل از بررسی TEM، باکتریوفاژ اختصاصی جدا شده از فاضلاب علیه *S. mutans* و *S. sanguinis* را نشان داد. باکتریوفاژ دارای سر Icosaheadral(80 nm) و دم طولی غیر منقبض شونده (185 nm) متعلق به خانواده *Siphoviridae* می‌باشد (تصویر شماره 4) .



تصویر شماره 3: پلاک لیتیک فاژ *S. sanguinis*



تصویر شماره 4: تصویر میگراف میکروسکوپ الکترونی (TEM). مورفولوژی فاژهای خانواده *Siphoviridae*

نتایج اختصاصیت میزبان باکتریوفاژ لیتیک جدا شده

به منظور تعیین اختصاصی بودن باکتریوفاژ برای *S. mutans* و *S. sanguinis* از روش spot test استفاده شد. سپس تعیین میزبان *S. mutans* و *S. sanguinis* جدا شده از پلاک دندان با استفاده از باکتری‌های زیر انجام پذیرفت. نتیجه به عنوان نمونه برای *S. mutans* به نمایش گذاشته شده است(تصویر شماره 5).

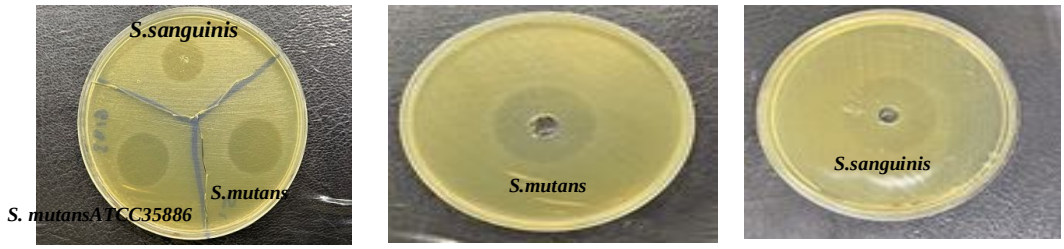
نتایج اثر مهاری باکتریوفاژ لیتیک بر مهار رشد و مهار تشکیل بیوفیلم S. mutans و S. sanguinis

نتایج اثردهی باکتریوفاژ بر مهار تشکیل بیوفیلم *S. mutants* و *S. sanguinis* با روش رنگ سنجی کریستال ویوله در میکروتیتر پلیت 96 خانه‌ای در OD550 نانومتر، همانگونه که در جدول شماره 2 نشان داده شده است تا 96 درصد توانایی مهار تشکیل بیوفیلم را پس از محاسبه فرمول(16) نشان می‌دهد (تصویر شماره 6).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-25]



تصویر شماره 5: تعیین اختصاصیت میزبان به عنوان نمونه برای *S. mutans*



تصویر شماره 6: مهار رشد *S. mutans* و *S. sanguinis* توسط فاژ لیتیک به روش *A*: انتشار در چاهک، B و C: لکه گذاری در آگار- از *S. mutans*ATCC*35886* به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید.

جدول شماره 2: OD بیوفیلم تشکیل شده توسط S. mutans و S. sanguinis قبل و بعد از اثر دهی با باکتریوفاژ در 550 نانومتر

نام باکتری	OD میانگین قبل از اثر دهی	OD میانگین بعد از اثر دهی
S. mutans	0/49	0/004
S. sanguinis	0/30	0/003

بحث

Streptococcus viridans، شامل گروه بزرگی از استرپتوکوک‌های آلفا همولیتیک همزیست ساکن دهان است که نقش مهمی در ایجاد پوسیدگی دارند. *S. mutans* ، کوکسی گرم مثبت و بی‌هوازی اختیاری، میکروبیوم حفره دهانی انسان و از مهم‌ترین عوامل پوسیدگی دندان است. *S. mutans* سوکروز را تخمیر می‌کند و با تولید اسید لاکتیک باعث ایجاد صدمه به مینای دندان می‌شود. هم‌چنین از سوکروز برای ساخت پلاک دندانی استفاده می‌کند(17). *S. mutans* به عنوان یکی ازمهم‌ترین و اصلی‌ترین عوامل ایجادکننده پوسیدگی دندان محسوب می‌شود. سطح دندان جایگاه اکولوژیکی بسیار مناسبی برای استقرار *S. mutans* است. از 150 پلاک مورد بررسی 65 جدایه (43/33 درصد) *S. mutans* و40 جدایه (26/67 درصد) *S. sanguinis* جداسازی شد. بررسی حضور *S. mutans* در سال 2017 توسط Abdulrahman و همکارانش در هند روی پلاک دندان نشان داد که از 65 نمونه پلاک مورد بررسی در افراد گروه سنی 33 تا 45 سال، 36 جدایه (38/ 55 درصد) *S. mutans* بودند که بیوتیپ I از *S. mutans* با 34جدایه (94/44 درصد) بیش‌ترین فراوانی را داشت و بین شاخص پوسیدگی و حضور *S. mutans* ارتباط معنی‌داری (P<0/05) نشان داده شد(18). در سال 2018 در عراق، Aljarah و همکارانشان از 120 نمونه مختلف سواب از دهان، *S. mutans* 62 مورد (51 درصد) با بیش‌ترین فراوانی در مقایسه با سایر اعضای خانوده mutans جداسازی گردید(19). مطالعات انجام شده درسال 2013 در شیلی توسط Vildosa و همکارانش بر 40 بیمار مستعد پوسیدگی دندان با دامنه سنی 50-18 سال نشان داد که 35 مورد (87/5 درصد) بر روی

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-25]

محیط‌های ترکیبی ارزیابی شده، برای *S. mutans* مثبت شدند(20).

دربررسی شیوع *S.mutans*، *S. sanguinis* و *S.salivarius* از دهان 20 نفر از افرادی که دارای دندان مصنوعی کامل بودند توسط Carlsson و همکاران در سال 1996، 17 مورد (85 درصد) *S. sanguinis*، 14 مورد (70 درصد) *S. mutans* جداسازی و *S. salivarius* از هیچ دندان مصنوعی جداسازی نگردید.که تفاوت فراوانی باکتری‌های به دست آمده در مقایسه با مطالعه ما می‌تواند علاوه بر جمعیت مورد مطالعه، تفاوت دندان مصنوعی و دندان پوسیده که به محیط مناسب به عنوان زیستگاه این استرپتوکوکوسی‌ها و هم‌چنین به تفاوت رژیم‌های غذایی و فرهنگ غذایی و همچنین به شرایط اقتصادی هم می‌توان اشاره نمود ولی فارغ از اختلاف درصدها نتایج نشان‌دهنده *S. mutans*، *S. sanguinis* به عنوان گونه‌های غالب جداسازی شده از پلاک دندان هستند و به نقش مهم این‌ها در ایجاد پوسیدگی می‌توان اشاره نمود(21).

در این مطالعه، برای بررسی سنجش توانایی تشکیل بیوفیلم *S. mutans* و *S. sanguinis* جداشده از نمونه‌های پلاک دندانی در ایجاد بیوفیلم، از میکروتیتر پلیت 96 خانه با TSB به همراه سوکروز 2 درصد و شست و شوی و سپس رنگ‌آمیزی با کریستال ویوله و جذب نوری در 550 نانومتر استفاده شد. نتایج حاکی از آن است که جدایه‌های به‌دست آمده توانستند طیف متفاوتی از بیوفیلم قوی تا ضعیف را به نمایش بگذارند ولی در این میان جدایه‌های *S. mutans*، بیوفیلم قوی‌تر را در مقایسه با *S. sanguinis* به نمایش گذاشت. در مطالعه Nobbs در سال 2009، با سنجش کریستال ویوله و استفاده از میکروتیتر پلیت، زیست توده بیوفیلم *S. Mutans* به تدریج از 0 تا 48 ساعت افزایش یافت. تشکیل بیوفیلم اولیه *S. mutans* را می‌توان در 24 ساعت مشاهده کرد(22).

بررسی ایجاد بیوفیلم در *S.salivarius* و *S. mutans* توسط Tamura و همکاران در پلیت 96 خانه نشان داد که *S. mutans* از قدرت تشکیل بیوفیلم بیش‌تری در مقایسه با *S.salivarius* برخوردار است و علاوه بر این، در کشت‌های ترکیبی، *S. salivarius* به شدت از تشکیل بیوفیلم *S. mutans* جلوگیری کرد که در نظر گرفته شده است که تنظیم CSP (Competence-Stimulation Peptide) توسط *glrA* در *S. mutans* و غیر فعال‌سازی CSP توسط *S. salivarius* عملکردهای مهمی برای ارتباط سلول به سلول بین باکتری‌های بیوفیلم و استرپتوکوک‌های دهانی هستند(23). در بررسی توانایی تشکیل بیوفیلم توسط 5 استرپتوکوکوس شایع دهانی توسط Pita و همکارانش در سال 2015 به روش میکروتیترپلیت و رنگ سنجی کریستال ویوله نشان داده شد که *S. mutans* بیش‌ترین توانایی تشکیل بیوفیلم را داشت. سپس *S.cricentus*، *S.sorbinus*، *S. sanguinis* و *S.salivarius* به‌ترتیب دارای بیش‌ترین توانایی تشکیل بیوفیلم بوده‌اند(24).

نتایج مطالعه ما و مطالعات مشابه در ایران و خارج از ایران بیان می‌دارد که *S. mutans* در بیش تر موارد توانایی تشکیل بیوفیلم را دارد. سایر *استرپتوکوکوس ویریدانس‌های* جدا شده هم توانایی تشکیل بیوفیلم نسبتا خوبی را از خود به نمایش گذاشته‌اند که نقش مهمی در شکل گیری چندین باکتری و افزایش نفوذ ناپذیری لایه‌های بیوفیلم دارد و هم‌چنین دارای نقش موثر در افزایش بیماری‌زایی سلول‌های تشکیل دهنده بیوفیلم همچنین در مقایسه با کشت پلانکتونی می‌تواند با تحمل بالاتر نسبت به pH کم همراه باشد.

رویکردی که در این مطالعه به منظور مهار تشکیل بیوفیلم استفاده شد، استفاده از باکتریوفاژ لیتیک علیه جدایه‌های بومی *S.mutans* و *S. sanguinis* بود. همان‌طور که میدانیم باکتریوفاژها با تعدادی قریب به 10^{32} فراوان‌ترین گونه زیستی کره زمین به‌شمار می‌روند و نقشی حیاتی در تنظیم جمعیت باکتری‌ها ایفا می‌نمایند(25). از میان راهکارهای جایگزین برای پیشگیری و کنترل عفونت‌های باکتریایی، یکی از پرطرفدارترین پیشنهادات استفاده مجدد از فاژ درمانی است. طرفداران این رویکرد مزایای قابل توجهی برای این روش نسبت به

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-25]

آنتی‌بیوتیک‌ها قائل هستند که از آن جمله می‌توان به اختصاصیت میزبان، تکثیر، تخریب بیوفیلم‌ها و سمیت کم برای انسان اشاره نمود. مطالعات مختلفی تاکنون در زمینه فاژ درمانی صورت گرفته است ولی مطالعات انجام شده روی باکتریوفاژ لیتیک *S. mutans*، *S. sanguinis* بسیار کم می‌باشد و فقط مطالعاتی برای فاژ *S. mutans* وجود دارد. در این مطالعه ما به جداسازی و تعیین هویت باکتریوفاژ لیتیک علیه *S. mutans*، *S. sanguinis* پرداختیم. نتایج تعیین هویت باکتریوفاژهای جداشده با میکروسکوپ الکترونی TEM نشان داد که باکتریوفاژ لیتیک علیه جدایه‌های *S. mutans*، *S. sanguinis* متعلق به خانواده *Siphoviridae* بودند. نتیجه اثر نهایی باکتریوفاژ لیتیک جداشده در مطالعه ما بر مهار تشکیل بیوفیلم به روش میکروتیتر پلیت نشان داد که تا 96 درصد قادر به ممانعت از تشکیل بیوفیلم توسط جدایه‌های *S. mutans* و *S. sanguinis* بودند.

بهشتی در سال 2015 (15) از آب دریای خزر و Dalmasso در سال 2015 (26) از بزاق، به عنوان منبع برای جمع‌آوری فاژهای *S.salivarious* و *S. mutans* استفاده کرده‌اند، اما در مطالعه حاضر فاضلاب خام شهری به عنوان منبع جداسازی باکتریوفاژ انتخاب شد. *Delisle & Rostkowski*، فاژهای خاصی را از بزاق انسان جدا کردند که اثرات لیتیک روی *S. mutans* داشت و متعلق به خانواده *Siphoviridae* بود(27). Dalmasso از غربالگری 85 نمونه بزاق ، توانست فقط یک فاژ را در برابر *S. mutans* جدا کند(26) و در سال 2003، Bachrach (28) و در سال 2004، *Hitch* (29) نتوانستند هیچ فاژی را در برابر *استرپتوکوکوس ویریدانس* دهانی از بزاق جدا کنند. Ahmed و همکارانش در سال 2019 به جداسازی *S. mutans* از پلاک‌های دندان پرداختند و متعاقب آن به دنبال جداسازی باکتریوفاژ لیتیک علیه آن در پلاک دندان پرداختند که موفق به جداسازی هیچ باکتریوفاژی نشدند(30). علت این‌که مطالعات از بزاق و یا پلاک دندان موفق به جداسازی فاژ نشده بودند احتمالاً به دلیل دشواری جداسازی فاژها از نمونه های حفره دهان و ایجاد کمبود اطلاعات در فاژهای خانواده *استرپتوکوکوس ویریدانس* است. بنابراین داشتن یک منبع مناسب برای جداسازی باکتریوفاژها بسیار مهم است. در مطالعاتی که همانند مطالعه ما موفق به جداسازی فاژ لیتیک *Siphoviridae* شدند نشان داده می‌شود که فاژهای خانواده *Siphoviridae* جزو فاژهای لیتیک *استرپتوکوکوس ویریدانس* می‌باشند که طبیعتا به خاطر فراوان بودن آن‌ها در طبیعت، جداسازی آن‌ها از منابع فاضلابی می‌تواند موثرتر از جداسازی بزاق و یا پلاک دندان باشد. مطالعه ما در مقایسه با مطالعات ذکر شده نشان داد که فاضلاب خام شهری منبع مناسب‌تری برای جداسازی فاژ است و برخلاف سایر مطالعات که فقط یک نوع فاژ *Siphoviridae* جداسازی شده بود درمطالعه حاضر موفق به جداسازی دو خانواده متفاوت فاژی شده‌ایم، که نشان از مناسب بودن منابع آبی و فاضلاب کشورمان جهت جداسازی فاژهای جدید لیتیک *S. mutans*، *S. sanguinis* و *S. salivarius* است، همان‌گونه که بهشتی در سال 2015(15) نیز دو خانواده جدید فاژی برای *S. salivarius* که متعلق به خانواده *Streptococcus viridans* است، را از آب دریای خزر جدا سازی نمود.

موفقیت درمان با باکتریوفاژها به طور اولیه وابسته به تکنولوژی تجویز آن‌ها می‌باشد. موفق‌ترین تجویزفاژ مسیر تجویز مستقیم سوسپانسیون آن بر روی منطقه عفونت می‌باشد و ایمونولوژی فاژها هنوز به‌طور گسترده‌ای شناسایی نشده است. یکی از مشکلات جدی در ایمن بودن فاژدرمانی پدیده فاژ معتدل است که این فاژها فقط قادر به قرار گرفتن در ژنوم باکتری هستند و این ممکن است سبب تغییر باکتری شود و باکتری را بیش‌تر مقاوم نماید، بنابراین مهم است که برای درمان از فاژ معتدل استفاده نشود. شواهد پیشنهاد می‌دهد که باکتریوفاژها به‌طور موثر بیوفیلم را ریشه‌کن می‌کند. با توجه به خصوصیات خارق‌العاده فاژ و کاربردهای مهم در صنعت و پزشکی در کنار گسترش روز افزون مقاومت

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-25]

آنتی بیوتیکی، رویکرد جدید استفاده از فاژ علی‌الخصوص در درمان بیماری‌های ناشی از ایجاد بیوفیلم مانند پلاک‌های دندانی و یا عفونت‌های ایجاد شده سوندهای ادرای و.... می‌تواند مورد استفاده قرار بگیرد، زیرا که قدرت نفوذ خیلی خوب و موثری را به درون بافت بیوفیلم می‌تواند داشته باشد.

سپاسگزاری

این پژوهش حاصل طرح مصوب دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران با کد اخلاق: *IR-TUMS.SPH.REC.1398.208* می‌باشد. بدینوسیله مجریان طرح از معاونت محترم پژوهشی دانشکده پیراپزشکی و معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی تهران کمال تشکر و قدردانی را دارند.

References

1. Forssten SD, Bjorklund M, Ouwehand AC. Streptococcus mutans, caries and simulation models. Nutrients 2010; 2(3): 290-298.
2. Birlutiu V, Birlutiu RM, Costache VS. Viridans streptococcal infective endocarditis associated with fixed orthodontic appliance managed surgically by mitral valve plasty. Medicine (Baltimore) 2018; 97(27): e11260.
3. Nicolas GG, Lavoie MC. Streptococcus mutans and oral streptococci in dental plaque. Can J Microbiol 2011; 57(1):1-20.
4. Khanafari A, Hosseini PS, Ebrahimi TM. Investigation of probiotic chocolate effect on Streptococcus mutans growth inhibition. Jundishapur Journal Microbiology 2012; 5(4): 590-597 (Persian).
5. Nobrega FL, Costa AR, Kluskens LD, Azeredo J. Revisiting phage therapy: new applications for old resources. Trends Microbiol 2015; 23(4): 185-191.
6. Sulakvelidze A, Kutter E. Bacteriophages: biology and applications, in Bacteriophages, Boca Raton: CRC Press; 2005.
7. Kutateladze M, Adamia R. Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics. Trends Biotechnol 2010; 28(591–595).
8. Jenny F: Fighting bacterial infections-future treatment options. Drug Res Updat 2011; 14(2): 125-139.
9. Chibani CS, Sidoti J, Bruttin A, Kutter E, Sarker S, Brussow H. In vitro and invivo bacteriolytic activities of Escherichiacoli phages: implications for phage therapy. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48(7): 2558-2569.
10. Jassim SAA, Limoges RG.Natural solution to antibiotic resistance: bacteriophages The living Drugs. World Journal Microbial Biotech 2014; 30(8): 2153-2170.
11. Fancello L, Desnues C, Raoult D, Rolain JM. Bacteriophages and diffusion of genes encoding antimicrobial resistance in cystic fibrosis sputum microbiota. J Antimicrob Chemother 2011; 66(11): 2448-2454.
12. Hoshino T, Kawaguchi M, Shimizu N, Hoshino N, Ooshima T, Fujiwara T. PCR detection and identification of oral streptococci in saliva samples using gtf genes. Diagn Microbiol Infect Dis 2004; 48(3): 195-199.
13. Jafari Sh, Mobasher MA, Najafipour S, Ghasemi Y, Mobasher N, Naghizade MM, et al. Evaluation of chlorella vulgaris extract inhibitory effects on growth, proliferation and biofilm formation by *S. mutans* and evaluation of its toxicity, J Fasa University of Medical Sciences 2015; 5(2): 387-396 (Persian).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-25]

14. Nikkhahi F, SoltanDallal MM, Alimohammadi M, Rahimi FA, Rajabi Z, Fardsanei F, et al. Phage therapy: assessment of the efficacy of a bacteriophage isolated in the treatment of salmonellosis induced by Salmonella enteritidis in mice. Gastroenterol Hepatol Bed Bench 2017; 10(2): 131-136.
15. Beheshti MK, Bouzari M, Arbabzadeh ZF. Biotechnological applications of two novel lytic bacteriophages of Streptococcus mutans in tooth decay bio-controlling. Curr Res Bac 2015; 8(4): 90-100.
16. Mahdavi M, Jalali M, Kermanshahi RK. The effect of nisin on biofilm forming foodborne bacteria using microtiter plate method. Res Pharm Sci 2009; 2(2): 113-118.
17. Mosaddad S.A, Tahmasebi E, Yazdanian A, Rezvani M.B, Seinfeldian A, Yazdanian M & et al. Oral microbial biofilms. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2019; 38: 2005-2019.
18. Abdulrahman SH, Senthikumar R, Imran Kh, Panneer SK. Isolation and Typing of *S.* mutans and Streptococcus sobrinus from Caries-active Subjects. Contemp Clin Dent 2017; 8(4): 587-593.
19. Aljarah A, Malik SA, Zainab R. Isolation and identification of *S*treptococcus mutans from dental caries by using SM479 gene. Indian J Public Health Res Dev 2018; 9(10): 667-670.
20. Vildosola GP, Fluxa PP, Saavedra ZP, Godoy FE, Batista O, Cortes MG. Recovering *S. mutans* over restorations by the tray technique-a randomized clinical study. Braz J Oral Sci 2013; 12(4): 292-297.
21. Carlsson J, SöderholmI G, Almfeldt I. Prevalence of *Streptococcus sanguis* and *Streptococcus* mutans in the mouth of persons wearing full-dentures. Arch Oral Biol 1996; 14(3): 243-249.
22. Nobbs AH, Lamont RJ, Jenkinson HF. Streptococcus adherence and colonization. Microbiol Mol Biol Rev 2009; 73(3): 407-450.
23. Tamura S, Yonezawa H, Motegi M, Nakao R, Yoneda S, Watanabe H, et al. Inhibiting effects of Streptococcus salivarius on competence-stimulating peptide-dependent biofilm formation by Streptococcus mutants. Oral Microbiol Immunol 2009; 24(2): 152-161.
24. Ehrenfest DDM, Wang HL, Bernard JP, Miato T, Sammartino G. New biomaterials and regenerative medicine strategies in periodontology, oral surgery, and esthetic and implant dentistry. Biomed Res Int 2015; 2015(210792): 1-3.
25. Cui Z, Gue X, Feng T , Li L. Exploring the whole standard operating procedure for phage therapy in clinical practice. J Transl Med 2019; 17(373):1-7.
26. Dalmasso M, Hass E, Neve H, Strain R, Cousin JF, Stockdale RS, et al. Isolation of a novel phage with activity against *S. mutans* Biofilms. PLOS ONE 2015; Online Published: 0138651.
27. Delisle AL, Rostkowski CA. Lytic bacteriophages of Streptococcus mutants. Curr J Microbiol 1993; 27(3): 163-167.
28. Bachrach G, L-Zigmond M, Zlotkin A, Naor R, Steinberg D. Bacteriophage isolation from human saliva. Lett Appl Microbial 2013; 36(1): 50-53.
29. Hitch G, Pratten J, Taylor PW. Isolation of bacteriophages from the oral cavity. Lett App Microbiol 2014; 39(2): 215-219.
30. Ahmed H, Flockhart A, Foley S & Foley J. Isolation of *Streptococcus mutans* and its bacteriophage from human plaque samples. Saudi J Oral Dent Res 2019; 4(8): 561-564.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-25]