

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 Alinejhad⁴,
Yousef Erfani⁵

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)

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^{2,1}
محمد رضا افرادی^{2,3}
دنیا علی نژاد⁴
یوسف عرفانی⁵

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 دندان 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 و یوله 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 (43/33 درصد) *S. mutans* و 40 مورد (26/67 درصد) *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 مهار 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.

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

مقدمه

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

E-mail: yerfani@tums.ac.ir

مؤلف مسئول: یوسف عرفانی - تهران: دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پیراپزشکی

1. دکتری میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات بیماری‌های مشترک انسان و دام (زنونوز)، 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

پوسیدگی دندان‌های یک بیماری مزمن و چندعاملی می‌باشد که به واسطه دمیترالیزاسیون 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 سال 1924 توسط Clarke جدا شد و به عنوان اولین و اصلی‌ترین شروع کننده‌ها و مستقر شونده‌ها در ایجاد بیوفیلم پلاک دندان 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 ارگانسیم‌ها 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 ایجاد کننده تشکیل بیوفیلم می‌باشد، 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 کشورهای 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 دندان‌های آن‌ها استفاده نمود ضروری به

نظر می‌رسد. درمان‌های آنتی‌بیوتیکی به دلیل افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی زنگ خطر 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 می‌باشد. با این وجود موفقیت فاژ درمانی وابسته به توانایی غلبه بر محدودیت‌های استفاده از آن‌ها به عنوان عامل درمانی می‌باشد (5).

در سال‌های 1915 و 1917 دو دانشمند به نام‌های Frederick Twort و Félix d'Hérelle در ضمن آزمایش‌های خود به طور اتفاقی به وجود این فاژها پی بردند. باکتریوفاژها (فاژها) ویروس‌هایی هستند که فقط باکتری را آلوده می‌کنند. تقریباً 50 برابر کوچک‌تر از باکتری هستند (200-20 نانومتر) 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 این که بر روی فلور طبیعی بگذارند سلول باکتری هدف را آلوده می‌کنند و به‌طور طبیعی با ریشه کن 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 سریعاً از سیستم گردش خون پاکسازی شده و به‌طور غالب در طحال و کبد ذخیره

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 *gtfD* و *gtfP* 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

درفس	PCR Product (bp)	Primer Sequence(5'-3')	Target Gene
12	431	F: GGCACCACAACATTGGGAAGCTCAGTT- R: GGAATGGCCGCTAAGTCAACAGGAT-	<i>gtfD</i>
2	313	F: GGATAGTGGCTCAGGGCAGCCAGTT- R: GAACAGTTGCTGGACTTGCTTGTC_	<i>gtfP</i>

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 داگ، تصویر ژل تهیه شد. جهت بهینه نمودن شرایط PCR در حجم 20 میکرولیتر انجام پذیرفت.

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

به منظور بررسی تشکیل بیوفیلم از روش کار جعفری و همکاران در سال 2015 استفاده شد. به طور خلاصه در پلیت 96 خانه پلی استیرن ابتدا 200 میکرولیتر از TSB به همراه سوکروز 2 درصد که حاوی کدورت نیم مک فارلند ($1/5 \times 10^8$) 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 میکرولیتر و در مرحله رنگ آمیزی از رنگ کریستال ویوله 1 درصد و در آخر اسید استیک گلاسیال استفاده

شده است. بیش تر شواهد پیشنهاد می‌دهد که پروتئین‌های سر باکتريوفاژها 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 باکتريوفاژ لیتیک اختصاصی بر تشکیل بیوفیلم توسط *S. mutans* و *S. sanguinis* بود.

مواد و روش‌ها

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

در این مطالعه مقطعی - توصیفی نمونه‌های پلاک دندان، توسط دندانپزشک از پلاک دندان‌های پوسیده مراجعه کنندگان به درمانگاه دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران (امیرآباد) 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 کربوهیدرات، تست هیدرولیز آرژنین و همچنین بررسی آنزیم اوره آز استفاده گردید. شرایط انکوباسیون 24-48 ساعت در دمای 37 درجه سانتی گراد با شرایط 5% CO₂ 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 (بولینگ) در دستگاه ترموبلاک BIOER انجام پذیرفت. جهت

پلیت مشاهده شود. خالص‌سازی باکتریوفاژ با ریختن SM بافر و تکرار مراحل بالا به منظور به دست 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 رنگ آمیزی شد و توسط میکروسکوپ TEM Zeiss-EM10C-100 KV دیده شد.

تعیین میزان و اختصاصیت باکتریوفاژ

برای تعیین میزان و اختصاصیت باکتریوفاژ از روش *spot test* استفاده شد. برای این منظور جدایه‌های *S. mutans* و *S. sanguinis* از پلاک دندان، *group A Enterococcus faecalis* ATCC29212، *Streptococci (Streptococcus pyogenes)* 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 باکتری‌ها 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 در سطح آگار ریخته شد، به طوری که سر سمپلر به سطح آگار تماس پیدا نکرد و یک شبانه روز در 37 درجه گرما گذاری شد. حساسیت به باکتریوفاژ به وسیله هاله شفاف مشخص گردید (15).

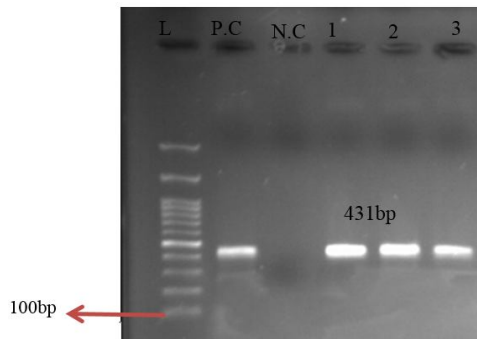
و جذب همه چاهک‌ها در 550 نانومتر قرائت شد. از *S. mutants* ATCC 35866 به عنوان کنترل مثبت و از رنگ کریستال ویوله و محیط کشت TSB به عنوان کنترل منفی استفاده گردید. شکل‌گیری بیوفیلم توسط فرمول‌های زیر طبقه‌بندی شده است: اگر (جذب نوری) $OD < ODc$ بیوفیلم تشکیل نشده باشد (منفی)، اگر $ODc < OD < 2 \times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

جداسازی باکتریوفاژ از نمونه فاضلاب

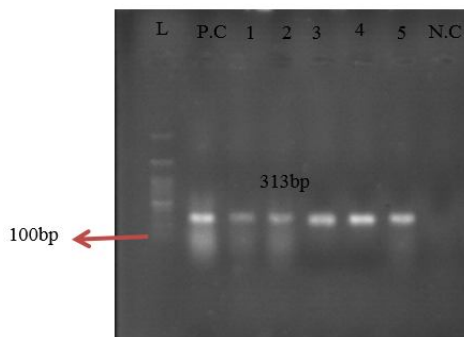
برای جداسازی باکتریوفاژ، فاضلاب خام شهری تهیه گردید. به مدت یک شبانه روز در دمای 4 درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس 6 میلی لیتر از فاضلاب به مدت 10 دقیقه در دور 6000g سانتریفیوژ و مایع رویی از یک فیلتر غشایی با اندازه 0/22 میکرومتر عبور داده شد. به منظور غنی‌سازی باکتریوفاژ به محلول صاف شده یک حجم یکسان 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. سانتریفیوژ مجدد کشت مایع در دور 6000g به مدت 10 دقیقه انجام و مایع رویی از یک فیلتر غشایی با اندازه 0/22 میکرومتر عبور داده شد. برای تایید حضور فاژ لیتیک در مایع صاف شده از روش Double layer استفاده شد. بدین منظور 100 میکرولیتر از مایع صاف شده با 400 میکرولیتر از کشت باکتری (با کدورت نیم مک‌فارلند) به مدت 30 دقیقه در دمای 37 درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس به 4/5 میلی لیتر 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 بر روی پلیت که نشانه وجود باکتریوفاژ لیتیک می‌باشد) انجام شد. این مراحل آنقدر تکرار گردید تا بتوان پلاک‌های لیتیک واضح و خوبی در

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، Ladder 100 bp : L
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 مورد نظر



تصویر شماره 2: نتیجه الکتروفورز ژن *gtfD* اندازه باند 313 bp، Ladder 100 bp : L
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 مورد نظر

اثر مهارتی فاژ بر رشد و مهار تشکیل بیوفیلم

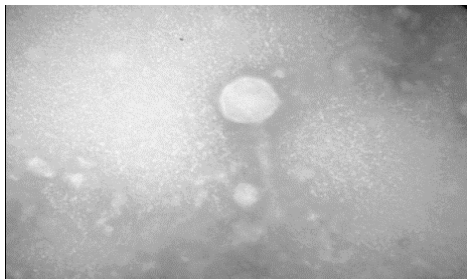
برای بررسی اثر فاژ بر مهار رشد از دو روش لکه‌گذاری در آگار (Agar Spot) و روش چاهک (Well Diffusion) استفاده گردید. در هر دو روش ابتدا به صورت چمنی از کدورت معادل نیم مک فارلند *S. mutans* و *S. sanguinis* به صورت جداگانه بر روی محیط BHI آگار کشت داده شد و در یک پلیت 10 ماکرولیتر از باکتریوفاژ به صورت لکه در مرکز پلیت قرار داده شد و در پلیت دیگر ابتدا به کمک انتهای پیست پاستور استریل چاهک ایجاد کرده و 100 ماکرولیتر از کشت تازه حاوی کدورت نیم مک‌فارلند *S. mutans* و *S. sanguinis* ریخته و سپس به مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد با شرایط 5% CO₂ 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 مک‌فارلند تهیه شد. سپس 100 ماکرولیتر از سوپانسیون باکتری با 50 ماکرولیتر از باکتریوفاژ در چاهک میکروتیتر پلیت ریخته شد و به مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد در شرایط 5% CO₂ 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 سانتی‌گراد با دور 120rpm به مدت 15 دقیقه گرماگذاری شد. OD هر چاهک در 550 نانومتر توسط دستگاه الیزا 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

تصویر شماره 3: پلاک لیتیک فاژ *S. sanguinis*تصویر شماره 4: تصویر میگراف میکروسکوپ الکترونی (TEM). مورفولوژی فاژهای خانواده *Siphoviridae*

نتایج اختصاصیت میزان باکتریوفاژ لیتیک جدا شده به منظور تعیین اختصاصی بودن باکتریوفاژ برای *S. sanguinis* و *S. mutans* از روش spot test استفاده شد. سپس تعیین میزان *S. sanguinis* و *S. mutans* 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 مهار باکتریوفاژ لیتیک بر مهار رشد و مهار تشکیل بیوفیلم *S. sanguinis* و *S. mutans*

نتایج اثردهی باکتریوفاژ بر مهار تشکیل بیوفیلم *S. sanguinis* و *S. mutans* با روش رنگ سنجی کریستال و بوله در میکروتیتر پلیت 96 خانه‌ای در 550OD 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).

نتایج توانایی تشکیل بیوفیلم توسط سویه‌های *S. mutans* و *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 سوکروز 2 درصد و شست و شوی و سپس رنگ آمیزی با کریستال و بوله و جذب نوری در 550 نانومتر انجام گرفت، که جدایه‌های به دست 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*

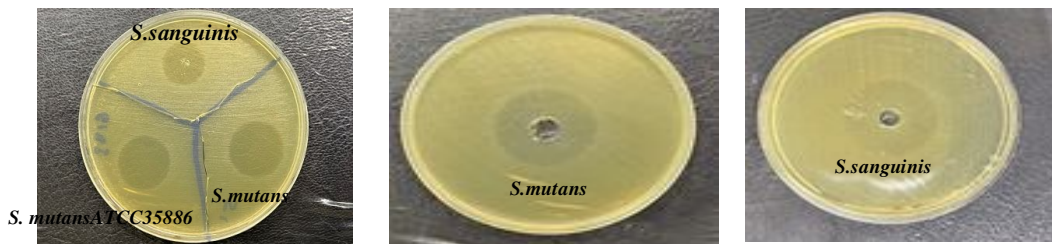
برای جداسازی باکتریوفاژ لیتیک مشاهده پلاک لیتیک باید صورت بگیرد. پس از جدا کردن اولیه باکتریوفاژ، به منظور خالص سازی آن یک پلاک از پلیت اولیه حاوی باکتریوفاژ با یک آنس استریل بریده و به کشت مایع 24 ساعته *S. sanguinis* و *S. mutans* اضافه شد و در نهایت به روش Double-layer agar پلاک گرفته شده و با استفاده از SM بافر پلاک ایجاد شده را از پلیت جداسازی شده و خالص گردید (تصویر شماره 3).

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 Icosahedral (80 nm) و دم طولی غیر منقبض شونده (185 nm) متعلق به خانواده *Siphoviridae* می‌باشد (تصویر شماره 4).



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



تصویر شماره 6: مهار رشد *S. mutans* و *S. sanguinis* توسط فاز لیتیک به روش A: انتشار در چاهک، B و C: لکه گذاری در آگار - از *S. mutans* ATCC35886 به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید.

بسیار مناسبی برای استقرار *S. mutans* است. از 150 پلاک مورد بررسی 65 جدایه (43/33 درصد) *S. mutans* و 40 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 (55/38 درصد) *S. mutans* بودند که بیوتیپ I از *S. mutans* با 34 جدایه (94/44 درصد) بیشترین فراوانی را داشت و بین شاخص پوسیدگی و حضور *S. mutans* ارتباط معنی داری ($P < 0/05$) 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 خانواده *mutans* جداسازی گردید (19). مطالعات انجام شده در سال 2013 در شیلی توسط Vildosa و همکارانش بر 40 بیمار مستعد پوسیدگی دندان با دامنه سنی 18-50 سال نشان داد که 35 مورد (87/5 درصد) بر روی

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
<i>S. mutans</i>	0/49	0/004
<i>S. sanguinis</i>	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 پلاک‌دندانی استفاده می‌کند (17). *S. mutans* به عنوان یکی از مهم‌ترین و اصلی‌ترین عوامل ایجادکننده پوسیدگی دندان محسوب می‌شود. سطح دندان جایگاه اکولوژیکی

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 سلول‌های *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 میکرو تیتربلیت 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* به ترتیب 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 بیش‌تر موارد توانایی تشکیل بیوفیلم را دارد. سایر استرپتوکوکوس ویریدانس‌های جدا شده هم توانایی تشکیل بیوفیلم نسبتاً خوبی را از خود به نمایش گذاشته‌اند که نقش مهمی در شکل‌گیری 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 باکتریوفاز لیتیک علیه جدایه‌های بومی *S. mutans* و *S. sanguinis* بود. همان‌طور که میدانیم باکتریوفازها 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 فائز درمانی است. طرفداران این رویکرد مزایای قابل توجهی برای این روش نسبت به

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

در بررسی 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* جدا شده از نمونه‌های پلاک‌دندانی در ایجاد بیوفیلم، از میکرو تیتربلیت 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 میکرو تیتربلیت، 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

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 می شود که فاژهای خانواده *Siphoviridae* جزو فاژهای لیتیک استرپتوکوکوس ویریدانس می باشند که طبیعتاً به خاطر فراوان بودن آنها در طبیعت، جداسازی آنها از منابع فاضلابی می تواند موثرتر از جداسازی بزاق و یا پلاک دندان باشد. مطالعه ما در مقایسه با مطالعات ذکر شده نشان داد که فاضلاب خام شهری منبع مناسب تری برای جداسازی فاژ است و برخلاف سایر مطالعات که فقط یک نوع فاژ *Siphoviridae* جداسازی شده بود در مطالعه حاضر موفق به جداسازی دو خانواده متفاوت فاژی شده ایم، که نشان از مناسب بودن منابع آبی و فاضلاب کشورمان جهت جداسازی فاژهای جدید لیتیک *S. mutans*، *S. sanguinis* و *S. salivarius* است، همان گونه که بهشتی در سال 2015 (15) نیز دو خانواده جدید فاژی برای *Streptococcus salivarius* که متعلق به خانواده *viridans* است، را از آب دریاى خزر جدا سازی نمود. موفقیت درمان با باکتریوفاژها به طور اولیه وابسته به تکنولوژی تجویز آنها می باشد. موفق ترین تجویز فاژ مسیر تجویز مستقیم سوسپانسیون آن بر روی منطقه عفونت می باشد و ایمونولوژی فاژها هنوز به طور گسترده ای 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 بیش تر مقاوم نماید، بنابراین مهم است که برای درمان از فاژ معتدل استفاده نشود. شواهد پیشنهاد می دهد که باکتریوفاژها به طور موثر بیوفیلم را ریشه کن می کند. با توجه به خصوصیات خارق العاده فاژ و کاربردهای مهم در صنعت و پزشکی در کنار گسترش روز افزون مقاومت

آنتی بیوتیک ها قائل هستند که از آن جمله می توان به اختصاصیت میزبان، تکثیر، تخریب بیوفیلم ها 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 می باشد 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 جدا شده با میکروسکوپ الکترونی TEM نشان داد که باکتریوفاژ لیتیک علیه جدایه های *S. mutans*، *S. sanguinis* متعلق به خانواده *Siphoviridae* بودند. نتیجه اثر نهایی باکتریوفاژ لیتیک جدا شده در مطالعه ما بر مهار تشکیل بیوفیلم به روش میکروتیتر پلیت نشان داد که تا 96 درصد قادر به ممانعت از تشکیل بیوفیلم توسط جدایه های *S. mutans* و *S. sanguinis* بودند.

بهشتی در سال 2015 (15) از آب دریاى خزر و Dalmasso در سال 2015 (26) از بزاق، به عنوان منبع برای جمع آوری فاژهای *S. salivarius* و *S. mutans* استفاده کرده اند، 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 پلاک های 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 این که مطالعات از بزاق و یا پلاک دندان موفق به جداسازی فاژ نشده بودند

سپاسگزاری

این پژوهش حاصل طرح مصوب دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران با کد اخلاق: IR-TUMS.SPH.REC.1398.208 می باشد. 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.

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

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).

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, Yazdani A, Rezvani M.B, Seinfeldian A, Yazdani 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 Streptococcus 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, Söderholm I 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. Dalmaso 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 mutans. *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 Microbiol* 2013; 36(1): 50-53.
29. Hitch G, Pratten J, Taylor PW. Isolation of bacteriophages from the oral cavity. *Lett Appl 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.