ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GTF GENİNİN MOLEKÜLER TESPİTİ VE BAKTERİYOSİN ÜRETİMİYLE AĞIZ FLORASI VE AĞIZ HASTALIĞINA NEDEN OLAN PATOJEN BAKTERİLER ARASINDAKİ İLİŞKİNİN İNCELENMESİ

Murtadha Kadhim Mallakh AL-DELIHEIM

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2023

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Murtadha Kadhim Mallakh AL-DELIHEIM tarafından hazırlanan **"Gtf Geninin Moleküler Tespiti ve Bakteriyosin Üretimiyle Ağız Florası ve Ağız Hastalığına Neden Olan Patojen Bakteriler Arasındaki İlişkinin İncelenmesi"** adlı tez çalışması 06/06/2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Ayşenur KAYABAŞ AVŞAR

Eş Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Thanaa Rasheed ABDULRAHMAN

Jüri Üyeleri :

Başkan : Dr. Öğr. Üyesi Filiz SARIKAYA PEKACAR
Biyoloji Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Ayşenur KAYABAŞ AVŞAR
Biyoloji Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Neslihan BAL
Biyoloji Anabilim Dalı
Gazi Üniversitesi

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Hamit ALYAR

Enstitü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum "**Gtf Geninin Moleküler Tespiti ve Bakteriyosin Üretimiyle Ağız Florası ve Ağız Hastalığına Neden Olan Patojen Bakteriler Arasındaki İlişkinin İncelenmesi**" konulu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, tezin Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nden başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve bu çalışmanın Çankırı Karatekin Üniversitesi tarafından kullanılan "Bilimsel İntihal Tespit Programı"yla tarandığını, "intihal içermediğini" beyan ederim. Çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması halinde ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm. Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim (06/06/2023).

Murtadha Kadhim Mallakh AL-DELIHEIM

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

GTF GENİNİN MOLEKÜLER TESPİTİ VE BAKTERİYOSİN ÜRETİMİYLE AĞIZ FLORASI VE AĞIZ HASTALIĞINA NEDEN OLAN PATOJEN BAKTERİLER ARASINDAKİ İLİŞKİNİN İNCELENMESİ

Murtadha Kadhim Mallakh AL-DELIHEIM

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ayşenur KAYABAŞ AVŞAR
Eş Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Thanaa Rasheed ABDULRAHMAN

Bu çalışmada farklı yaşlardan ve her iki cinsiyetten hem sağlıklı (n=60) hem de hasta (n=60) bireylerden toplam 120 sürüntü örneği alınmıştır. Bakteriyel izolatların tanısında Vitek II teknolojisi, geleneksel biyokimyasal ve kültür testleri kullanılmıştır. Hasta bireylerden alınan örneklerde, izolatların %47'sinin *Streptococcus mutans*'a ait olduğu görülmüştür. Bakteri izolatlarının antibiyotiklere duyarlılığı Kirby-Bauer disk difüzyon tekniğiyle yapılmıştır ve izolatların çoğu antibiyotiklere karşı direnç göstermiştir. Mikro plaka yöntemiyle *S. mutans* izolatlarının çoğu biyofilm üretmiştir. İzolatlarda 16s rRNA ve gtf geninin tespiti PCR kullanılarak istatistiksel olarak anlamlı bir oranda gösterilmiştir. Yerel olarak izole edilen *Lactobacillus sakei* bakteriyosin üretiminde etkin izolatı seçmek için taranmıştır. Bakteriyosinin antibakteriyel aktivitesi, 200 µg/mL'de 19 ila 23 mm arasında değişen inhibisyon zonlarına göre 10 *S. mutans* izolatının tümü üzerinde yüksek etki göstermiştir. Bu tez kapsamında, gtf geninin moleküler olarak tespit edilmesi ve bakteriyosin üretimiyle ağız florası ve ağız hastalığına neden olan patojen bakteriler arasındaki ilişkinin incelenmesi amaçlanmıştır.

2023, 77 sayfa

ANAHTAR KELİMELER: *Streptococcus mutans*, Bakteriyosin, gtf, Biyofilm, Diş çürükleri

ABSTRACT

Master of Science Thesis

MOLECULAR DETECTION OF GTF GENE AND EXAMINATION OF THE RELATIONSHIP BETWEEN THE ORAL FLORA AND THE PATHOGENIC BACTERIA CAUSED BY ORAL DISEASE WITH BACTERIOSIN PRODUCTION

Murtadha Kadhim Mallakh AL-DELIHEIM

Çankırı Karatekin University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Ayşenur KAYABAŞ AVŞAR
Co-Advisor: Asst. Prof. Dr. Thanaa Rasheed ABDULRAHMAN

A total of 120 swab samples were taken from both healthy (n=60) and unhealthy (n=60) individuals of these different ages and both genders. Vitek II technology, traditional biochemical and culture tests were used for the diagnosis of bacterial isolates. In samples taken from sick individuals, 47% of the isolates were found to belong to *Streptococcus mutans*. The susceptibility of bacterial isolates to antibiotics was determined by the Kirby-Bauer disk diffusion technique and most of the isolates showed resistance to antibiotics. Most of the *S. mutans* isolates produced biofilms by the microplate method. Detection of 16s rRNA and gtf gene in isolates was demonstrated at a statistically significant rate using polymerase chain reaction. Locally isolated *Lactobacillus sakei* was screened to select isolate active in bacteriocin production. The antibacterial activity of bacteriocin was high on all 10 *S. mutans* isolates with respect to zones of inhibition ranging from 19 to 23 mm at 200 µg/mL. In this thesis, we aimed to determine the gtf gene molecularly and to examine the relationship between bacteriocin production and oral flora and pathogenic bacteria that cause oral disease.

2023, 77 pages

Keywords: *Streptococcus mutans*, Bacteriocin, gtf, Biofilm, Dental caries

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Tez danışmanım Doç. Dr. Ayşenur KAYABAŞ AVŞAR'a bilimsel rehberliği, sabrı ve anlayışı için çok teşekkür ederim. Aynı zamanda eş danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Thanaa Rasheed ABDULRAHMAN'a da destekleri için teşekkür ederim.

Her an yanımda olan, desteklerini esirgemeyen aileme ve arkadaşlarıma da teşekkürü bir borç bilirim.

Murtadha Kadhim Mallakh AL-DELIHEIM
Çankırı, Haziran 2023

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **i**
ABSTRACT ..... **ii**
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR ..... **iii**
İÇİNDEKİLER ..... **iv**
SİMGELER DİZİNİ ..... **vi**
KISALTMALAR DİZİNİ ..... **vii**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **viii**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **ix**
1. GİRİŞ **1**
1.1 Çalışmanın Amacı **3**
2. LİTERATÜR ÖZETİ **4**
2.1 Ağız Sağlığının Tanımı **4**
2.2 Oral Mikrobiyal Topluluk **5**
2.3 Oral Streptokoklar **6**
2.4 *Streptococcus equinus* **6**
2.4.1 *Streptococcus mutans* **7**
2.4.2 Glukoziltransferazlar (GTFs) **9**
2.4.3 *Streptococcus mutans*'ın sınıflandırılması **9**
2.4.4 *Streptococcus mutans*'ın virülans faktörleri **10**
2.5 Diş Çürükleri **16**
2.5.1 Diş çürüklerini etkileyen risk faktörleri **18**
3. MATERYAL VE METOT **21**
3.1 Çalışma Dizaynı **21**
3.2 Örneklerin Toplanması **21**
3.3 Materyaller **21**
3.3.1 Ekipman ve aparatlar **21**
3.3.2 Kimyasal ve biyolojik malzemeler **22**
3.3.3 Kültür ortamı **22**
3.3.4 Antimikrobiyal ajanlar **23**
3.3.5 Kitler **23**

3.3.6 Primerler 24
Dizilimi (5' - 3') 24
3.4 Metodlar 24
3.4.1 Sterilizasyon yöntemleri 24
3.4.1 Çözeltilerin ve reaktiflerin hazırlanması 25
3.4.2 Kültür ortamının hazırlanması 26
3.4.3 VITEK 2 Compact Sistemi ile izolatların teşhisi 29
3.4.4 Tanımlanmış suşların korunması 29
3.4.5 Biyofilm oluşumu 30
3.4.6 Antibiyotik duyarlılık testi 31
3.4.7 Moleküler çalışma 32
3.4.7.2 Termal döngü protokolü 33
3.4.8 Bakteriyosin üretimi için bakteri izolatlarının taranması 34
3.4.9 *S. mutans* bakterisi üzerinde antimikrobiyal aktivite tespiti 35
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 37
4.1 *Streptococcus mutans*'ın İzolasyonu 37
4.2 *Streptococcus mutans*'ın Bakteriyel Tanısı 38
4.2.1 *S. mutans*'ın kültür karakterleri 38
4.3 *S. mutans*'ın Hızlı Ayırt Edilmesi 38
4.4 Mikroskobik İnceleme 39
4.5 Biyokimyasal Testler 39
4.6 Biyofilm Oluşumu 40
4.7 *S. mutans*'ın Antibiyotik Duyarlılık Testi 42
4.8 PCR kullanılarak *16S rRNA* ve Gtf*D*'nin Moleküler Tanımlanması 44
4.9 Bakteriyosin Üretiminde *L. sakei* İzolatlarının Taranması 47
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 52
5.1 Sonuçlar 52
5.2 Öneriler 52
KAYNAKLAR 54
EKLER 74
ÖZGEÇMİŞ 77

SİMGELER DİZİNİ

R	Direnç
g	Gram
MTP	Mikro Titre Plakası
µg/mL	Mikrogram/mililitre
ml	Mililitre
mm	Millimetre
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
^{o}C	Santigrat
%	Yüzde

KISALTMALAR DİZİNİ

AMELX	Amelogenin – X
AMPs	Antimicrobial peptides
DEFB1	Defensin Beta 1
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
Gbp proteins	Glukan bağlayıcı proteinler
GTFs	Glukoziltransferazlar
GTF*B*	Glukoziltransferazlar B
GTF*C*	Glukoziltransferazlar C
GTF*D*	Glukoziltransferazlar D
HOMD	İnsan Oral Mikrobiyom Projesi Veritabanı
CAT	Katalitik
CFU	Koloni Oluşturan Birim
LAB	Laktik asit bakterileri
MSA	Mitis Salivarius Agar
MSBA	Mitis Salivarius Bacitracin Agar
PAc	Protein antijeni c
RGPs	Ramnoz-glikoz polimerleri
S. mutans	*Streptococcus mutans*
S. sanguinis	*Streptococcus sanguinis*
RSM	Tepki yüzey metodolojisi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Oral biyofilm oluşumu 13
Şekil 2.2 Lantibiyotik mutasinin kimyasal yapısı 14
Şekil 4.1 Sağlıklı ve hasta ağız sürüntülerinden izole edilen izolatların yüzdesi 37
Şekil 4.2 MSBA besiyerinde *S. mutans* 38
Şekil 4.3 MSA besiyerinde %10 Mannitol ve %4 TTC eklenmeden önce ve sonra *S. mutans* kolonileri 39
Şekil 4.4 *S. mutans*'ın Gram boyaması 39
Şekil 4.5 Mikro Titer Plaka yöntemi ile *S. mutans*'ın biyofilm oluşumu 40
Şekil 4.6 *S. mutans* izolatları tarafından biyofilm oluşturma yüzdesi 41
Şekil 4.7 *S. mutans*'ın antibiyotiklere karşı direnç yüzdesi 43
Şekil 4.8 %2 Agaroz jel üzerinde elektroforez edilmiş gtf*D* (*S .mutans*) bölgesinin 135 bp'lik PCR ürünü. 47

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 *S. mutans*'ın sınıflandırılması 10
Çizelge 3.1 Cihazlar ve aletler 22
Çizelge 3.2 Kimyasal ve biyolojik malzemeler 22
Çizelge 3.3 Kültür ortamı 23
Çizelge 3.4 Antimikrobiyal disk 23
Çizelge 3.5 Kitler 24
Çizelge 3.6 Çalışmada kullanılan primer dizileri 24
Çizelge 3.7 Çalışmada kullanılan PCR reaksiyon karışım hacimleri protokolü 33
Çizelge 3.8 Termal Döngü Protokolü 33
Çizelge 4.1 *S. mutans* izolatları için biyofilm oluşumu 40
Çizelge 4.2 Antimikrobiyal disk 42
Çizelge 4.3 *L. sakei*'nin *S. mutans*'a karşı inhibisyon zonları ile ifade edilen bakteriyosin üretim yeteneği 48

1. GİRİŞ

Ağız boşluğu, insan vücudunun ayrılmaz bir parçası ve küçük bir ekosistemdir (Kitamoto *et al.* 2020). Bir bireyin ağız sağlığı dişlerinin, diş etlerinin ve ağız boşluğu astarlarının yüzeylerinde sağlıklı doğal mikrofloranın varlığına bağlıdır (Alghamdi 2022). Bakteriler, mantarlar ve virüsler de dahil olmak üzere çeşitli türlerden oluşur (Sultan *et al.* 2018). Moleküler ve mikrobiyolojik tekniklerin geliştirilmesi sayesinde 700'den fazla tür tanımlanmıştır ve henüz tanımlanmamış çok daha fazla tür vardır (Willis and Gabaldón 2020).

Dünya çapında insanları etkileyen en yaygın ağız hastalıklarından biri diş çürükleridir (Peres *et al.* 2019). Bir dizi karmaşık kimyasal reaksiyon sırasında ve diş plağı üzerinde bir biyofilm oluşumuna bağlı mikrobiyal faaliyetlerin bir sonucu olarak başlayan diş çürükleri, dişlerin kalsifiye dokularından minerallerin uzaklaştırılmasına ve organik bileşenlerin ayrışmasına neden olan kronik bir enfeksiyoz hastalıktır.

Diş çürüğü önemli halk sağlığı sorunlarından biridir (Al-Nasser and Lamster 2020). Anaerobik koşullar altında, diyetteki karbonhidratlar birincil enerji kaynağıdır ve organik asitlerin oluşmasına neden olur, bu da diş yüzeyindeki pH'ın ~4.5'e düşmesine neden olarak demineralizasyonla sonuçlanır (Cruvinel *et al.* 2019).

Normal ağız boşluğunda *Streptococcus, Lactobacillus, Lactococcus, Corynebacterium, Veillonella* ve *Bacteroids* cinslerinin farklı türleri baskındır (Deo and Deshmukh 2019). *S. mutans* bunlardan biridir ve diş çürükleriyle bağlantılı yüksek derecede karyojenik bakteridir (Lemos *et al.* 2019).

Gram-pozitif, fakültatif anaerobik bakteri *S. mutans*'ın diş yüzeylerinde dental plak olarak bilinen biyofilmi oluşturabilmesi için hem asidojenik hem de asidürik özelliklere sahip olması gerekir (Freire *et al.* 2021). Glukoziltransferazlar (Gtf) bakterinin sükrozdan yapışkan glukan üretmesine yardımcı olur ve glukanlar daha sonra bakteri

hücrelerinin diş yüzeylerine sıkıca tutunmasına yardımcı olur (Alejandra and Daniel 2020).

Yapışmayı teşvik etmesi beklenen çok sayıda glukan bağlayıcı protein (Gbp proteinleri) (Zhang *et al.* 2022) de bakteri tarafından üretilmektedir. Ayrıca, önemli bir yüzey proteini olan *S. mutans*'ın hücre yüzeyi proteini antijen C (PAc), tükürük pelikülü ile etkileşim yoluyla diş yüzeylerine bakteriyel yapışmaya yardımcı olduğu bilindiğinden, diş çürüğünün ortaya çıkmasıyla ilgili olarak organizmanın virülansıyla bağlantılıdır (Zhang *et al.* 2021). Bu bakteriyel yüzey proteinleri, diş çürüğüne neden olan diş plağını oluşturmak için birlikte çalışır (Leelaruangsang *et al.* 2021).

Ekosistemdeki diğer bakterilerle rekabet edebilmek için bir bakteri, bakteriyel ribozomlar tarafından sentezlenen bakteriyosin adı verilen uzun bir peptit zinciri kullanır (Simons *et al.* 2020). Ağız topluluğu, bakterilerin çeşitliliğine ve ekolojik uygunluğuna katkıda bulunan bakteriyosinler üretir. Doğal olarak oluşan ağız boşluğu sakinlerinin çeşitli türleri, ağız florasının gelişimini kontrol eden quorum sensing yoluyla bakteriyosin oluşturur (Zimina *et al.* 2020).

Yeni ilaç sınıflarının geliştirilmesi yavaşlarken, antibiyotiklere dirençli mikroorganizmalar daha yaygın bir şekilde yayılmaktadır (Ardal *et al.* 2020).. Bu sorunların her ikisi de genel halk sağlığını etkilemektedir. İlk durumda, antibiyotiklerin tekrar tekrar kullanılması, dirençli bulaşıcı organizmaların gelişmesine yol açarak antibiyotiklerin etkinliğini azaltmıştır (Wang *et al.* 2019a).

Bakteriosinin önemli bir terapötik etkinlik gösterdiği gösterilmiştir. Keşfi, kalıcı bakteriyel enfeksiyonlar ve çoklu ilaca dirençli hastalıklar da dahil olmak üzere antibiyotik direnciyle mücadelede önemli bir ilerleme olarak kabul edilmektedir (Vivas *et al.* 2019). Çoğunlukla bakterisidal, antibiyotik benzeri maddelerdir ve öncelikle aynı veya yakın akraba türlerin suşlarına karşı etkili olan çeşitli bakteriler tarafından üretilirler ve sınırlı etki özgüllükleri ve protein bileşimleri nedeniyle diğer (klasik) antibiyotiklerden farklıdırlar (Dai *et al.* 2020).

1.1 Çalışmanın Amacı

- Ağız bakterilerinin ağız hastalıklarındaki rolünü araştırmak.

- Mikrobiyota ve patojen bakteriler arasında etkenler açısından ayrım yapmak.

- Diş çürüklerinden *S. mutans*'ın izolasyonu ve tanımlanması.

- Bakterilerin biyofilm oluşturma yeteneklerini incelemek.

- İzole edilen bakterilerin antibiyotik disk difüzyon yöntemi kullanılarak antibiyotik duyarlılık testinin araştırılması.

- İzolatların *16S rRNA* ve gtf*D* genleri ile moleküler tespiti.

- *S. mutans* izolatları üzerinde bakteriyosinin antibakteriyel aktivitesinin incelenmesi.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Ağız Sağlığının Tanımı

Ağız sağlığı hizmetlerinin önündeki en büyük engellerden biri, diş hizmetlerinin eksikliğidir. Bu, Amerika Birleşik Devletleri'ndeki en büyük karşılanmamış ağız sağlığı ihtiyacı olarak adlandırılabilir (Merk *et al.* 1995). Amerika Birleşik Devletleri'nde yaşayan birçok insan, bakıma erişim eksikliği nedeniyle kötü ağız sağlığına sahiptir, çünkü ağız sağlığı evrensel olarak birincil veya davranışsal sağlık hizmetlerine entegre edilmemiştir. Sonuç olarak, diş bakımı genellikle diğer sağlık bakım türlerinden ayrı tutulur (Mueller *et al.* 1994).

Ağız sağlığı, kişinin ağız ve ilgili sistemlerinin durumunun ötesine geçerek sosyal ve zihinsel refahını da kapsayacak şekilde genel sağlığını da etkilemektedir (Gil-Montoya *et al.* 2015, Tonetti *et al.* 2017).

Ağız boşluğunun başladığı vermillion sınırı, deri ile dudaklar arasında yer alır. Bundan sonra ağzın sert damak şeklindeki çatısına ulaşılır. Ağız boşluğunun ardından bademcikler, dil ve yumuşak damağı barındıran orofarenks gelir (Shyam and Cohen 2021). İç yanağın mukoza zarına bukkal mukoza denir. Vestibül, çekler, dudaklar, yüz diş yüzeyleri ve diş etleri ile çevrili alandır. Üst ve alt dudakların ağız köşesinde kesiştiği yer labial komissür olarak bilinir (Darby and Walsh 2010).

Bu sistemler konuşma, nefes alma ve beslenme gibi çeşitli bedensel işlevleri yönetir. Kötü diş hijyeni alışkanlıkları böylesine karmaşık bir organ sistemine ciddi zarar verme potansiyeline sahiptir. Bu nedenle ağız hastalıklarına yakalanma olasılığını azaltacak önlemleri araştırmak önemlidir (Soldani *et al.* 2018).

2.2 Oral Mikrobiyal Topluluk

Her 3.0 x 1013 insan hücresine karşılık yaklaşık 3.8 x 1013 bakteri hücresi yetişkin bir insanın vücudunda bulunmaktadır (Sender *et al.* 2016). İnsan vücudundaki muazzam kommensal bakteri topluluğu, ağız boşluğunda bağırsaklardan sonra ikinci sırada yer almaktadır (Deo and Deshmukh 2019). Dişler, dil, diş eti sulkusu, yanak, bukkal mukoza, bademcikler, sert damak ve yumuşak damak ağız boşluğunu oluşturan yumuşak ve sert dokular arasındadır. Bu dokular bakteri üremesi için elverişli bir ortam oluşturur (Dewhirst *et al.* 2010).

Ağız mikrobiyomu, çekirdek mikrobiyom ve fizyolojik değişikliklere, yaşam tarzı seçimlerine ve genel sağlığa bağlı olarak değişebilen değişken bir mikrobiyotadan oluşur (Deo and Deshmukh 2019). İnsan Oral Mikrobiyom Projesi Veritabanı (HOMD)'na göre, insan ağız boşlukları 700'den fazla farklı türde oral bakteri içermektedir (Mark Welch *et al.* 2016). Çağdaş dizileme tekniklerinin kullanılması, ağız boşluğunda daha çeşitli bakteri türlerinin tespit edilmesine olanak sağlayabilir (Sizova *et al.* 2012).

16S rRNA dizilemesinden, tek bir insan ağız boşluğunda 75 ila 150 oral bakteri türü bulunmuştur (Peterson *et al.* 2011, Yoshizawa *et al.*, 2013). Firmicutes, Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria, Spirochaetes, Fusobacteria, Tenericutes, Chylamydiae, Synergistetes, TM7, Chlorobi, Chloroflexi, GN02, SR1 ve WPS-2, HOMD tarafından tanımlanan 15 bakteri filumudur (Camanocha and Dewhirst 2014).

Mikrobiyota, oral topluluktaki konağı hem hastalığın ilerlemesi hem de sağlığın geliştirilmesi açısından etkiler (Mark Welch *et al.* 2016). Bazı bakteriler enerji üretimi, ortam kimyasal detoksifikasyonu, faydalı bakterilerin büyümesini teşvik etme ve hastalık yayılımını önleme gibi çeşitli yöntemlerle ağız homeostazını korumak ve hastalıkların başlamasını önlemede oldukça önemlidir (Kilian *et al.* 2016). Bununla birlikte bazı bakteriler diş çürüğü, periodontitis ve gingivitis etiyolojisi gibi bozuklukların gelişiminde rol oynamaktadır (Colombo and Tanner 2019).

2.3 Oral Streptokoklar

Genellikle oral streptokoklar olarak bilinen viridans streptokoklar, ağız boşluğundan izole edilmeyen üyeleri de içermektedir (Abranches *et al.* 2018). Beş farklı oral streptokok grubu vardır: *Mutans* grubu (*S. mutans* ve *S.sobrinus* öne çıkan üyelerdir), *Salivarius* grubu (*S.salivarius*), *Anginosus* grubu (*S.anginosus* ve *S.intermedius*), *Sanguinis* grubu (*S.sanguinis* and *S.gordonii*) (Alves *et al.* 2019).

Erken kolonizatör *S.gordonii*, *S.sanguinis* ve yakın zamanda keşfedilen *S.oligofermentans* gibi bazı oral streptokokların kan yoluyla yayıldığında enfektif endokardite neden olduğu bilinmektedir (Klein 2022). Viridans grubu streptokoklar sıklıkla ağız boşluğu mikroorganizmaları olarak tanımlanır çünkü koloniler kanlı agarı yeşile çevirir (Yumoto *et al.* 2019).

İnsan ağzı ve üst solunum yollarının tipik mikrobiyal ekolojisi, önemli bir bölüm olarak oral veya viridans streptokokları içerir (Hoshino *et al.* 2022) . Bazı türler başka yerlerden ve dışkıdan izole edilebilse de, bu yerler doğal yaşam alanlarını temsil ediyor gibi görünmektedir (Quan *et al.* 2020).

2.4 *Streptococcus equinus*

İnsan sağlığı üzerinde olumsuz etkisi olan önemli enfeksiyonlar *Streptococcus* cinsinde bulunur (Richards *et al.* 2014). Van Leeuwenhoek, *Streptococcus* cinsini ilk olarak 1683 yılında dişlerinden aldığı nesnelerin mikroskobik görünümlerini çizimlerinde tasvir etmiştir. Yunanca strepto (bükülmüş) ve coccus (küresel) kelimeleri *Streptococcus* kelimesinin kökenidir (Patel and Gupta 2018).

Büyük olasılıkla Shottmuller, streptokokları birbirinden ayırmak için ilk denemeyi 1903 yılında, beta-hemolitik olan suşları olmayanlardan ayırmak için kanlı agar kullanarak yapmıştır. 1933'ten önce, streptokokların birçoğu sadece fermantasyon ve tolerans testleri ile ayırt edilebiliyordu. Lancefield, beta-hemolitik bakterilerle bağlantılı belirli

karbonhidrat grubu antijenlerini gösterme yöntemini ilk kez 1933 yılında tanımlamıştır (Prithika and Balamurugan 2018).

Bazı araştırıcılar streptokokları dört gruba ayırmak için bir sistem önermiştir. Bu kategorileri düzenlemek için hemolitik tepki, grup karbonhidrat antijenleri ve fenotipik testler (esas olarak fermantasyon ve tolerans testleri) kullanılmıştır (Tagg *et al.* 2019). Piyojenik, oral ve anaerobik streptokoklara ek olarak, başka bir grup da bulunmaktadır (Kurylek *et al.* 2022). Bu grup, gram-pozitif hücrelere sahiptir ve küresel veya oval şekildedir. Çapları 0,5-2,0 mikron arasında değişir ve çiftler veya zincirler halinde bulunurlar.

Streptokoklar büyümek için besin açısından zengin ortamlara ihtiyaç duyar (Jans *et al.* 2015). Fermentatif metabolizma çoğunlukla laktat üretimiyle sonuçlanır ve gaz üretmez. Streptokoklar sıklıkla kırmızı kan hücrelerine saldırarak ya tamamen temizlenmelerine (hemoliz) ya da yeşilimsi bir renk almalarına (katalaz-negatif-hemoliz) neden olurlar. Büyüme için ideal sıcaklık 37°C'dir ve tipik büyüme aralığı 25-45°C'dir (Wu *et al.* 2021). Tipik olarak dışkı ile bağlantılı olan *Enterococcus*, bitkiler ve süt ürünleri ile bağlantılı olan *Lactococcus* ve *Streptococcus* türleri Streptococcaceae ailesini oluşturur (Parmanand *et al.* 2019).

Streptococcus üyeleri, insan klinik örneklerinden sıklıkla izole edilen klinik olarak önemli türlerdir (Teixeira *et al.* 2015). *Mitis, anginosus, salivarius, mutans*, bovis ve piyojenik gruplandırmalar altı ana küme veya tür grubu altında toplanır (Pontigo *et al.* 2015).

2.4.1 *Streptococcus mutans*

S. mutans diş çürüğü gelişiminde en önemli bakteridir (Forssten *et al.* 2010). Erken kolonizatör olarak dental plak biyofilminin oluşumunda önemli bir rol oynayan gram-pozitif bir bakteridir. En iyi 37°C'de üreyen, genellikle çiftler veya zincirler halinde

bulunan, asidürik (asit ortamında iyi üreyen) ve asidojenik (asit oluşturan), hareketli olmayan fakültatif anaeroblardır (Koning 2010, Wang and Ren 2017).

S. mutans kalın bir hücre duvarına sahiptir. Hücre duvarı, hücre protoplastının ozmotik lizisini önleyen ve hücreye sertlik ve şekil kazandıran peptidoglikan (murein) ve teikonik asitten oluşur. *S. mutans* polisakkaritten oluşan kapsüle sahiptir ve yapısal birimi dekstran glukozdur (Liao *et al.* 2017).

Glikoz polimerlerinin yan zincirlerini ramnoz polimerinin omurgası ile birleştiren hücre yüzeyi Ramnoz-glikoz polimerlerinin (RGP'ler) kimyasal yapısına dayanarak, *S. mutans* dört serotipe (c, e, f ve k) ayrılır (GC *et al.* 2019).

Diğer plak bakterilerine ve minenin tükürük pelikülüne yapışabilme yetenekleri nedeniyle *S. mutans* diş çürüklerinin oluşumunda çok önemlidir. *Mutans* streptokokları ve laktobasiller çok fazla asit üretir, bu da ortamı asidik hale getirir ve çürük riskini artırır (Hemadi *et al.* 2017).

Genellikle, *S. mutans* diş çürüklerinde ilk kez görüldükten 6 ila 24 ay sonra çürük gelişir. Ağız, yutak ve bağırsak *S. mutans*'ın üç ana yaşam alanıdır.

Diş çürüğüne neden olmak için glikoz ve sükroz gibi karbonhidratları metabolize ederek asit üretir ve erken kolonize olan bakterilerle biyofilm gelişimini artırır. *S. mutans*'ın yüksek asidojenitesi ve büyük miktarlarda glukan sentezlemek için diyet sükrozunu kullanması nedeniyle karyojenik biyofilmin gelişimine önemli bir katkı sağlar (Lee *et al.* 2012).

Mutans, Salivarious, Anginosus, Mitis, Sanguinis ve Bovis gruplarını da içeren Firmicutes filumuna aittir (Doern and Burnham 2010). Hücre yüzeyindeki ramnoz-glikoz polimerinin yapısına göre *S. mutans* dört serotipte sınıflandırılabilir: c, e, f ve k. Bu dört serotipten en yaygın olanı serotip c'dir (Braga *et al.* 2013).

2.4.2 Glukoziltransferazlar (GTFs)

S. mutans'ın ürettiği üç farklı gtf (gtf*B*, gtf*C* ve gtf*D*), bakteri hücrelerinin yapışması için birlikte çalışmalıdır; 5:0.25:1 oranı, maksimum düzeyde sükroza bağlı hücresel yapışma ile sonuçlanır (Zhang *et al* .2021). Öncelikle -1,3-glukozidik bağlar bakımından zengin suda çözünmeyen glukanlar üreten gtf*B* ve gtf*C*'yi kodlayan genler hücre yüzeyinde bulunur (Nakamura *et al.* 2020).

Öte yandan, -1,6-glukozidik bağlar bakımından zengin suda çözünür glukanlar üreten ve gtf*D* geni tarafından kodlandığı bilinen gtf*D*, kültür süpernatantında bulunmuştur (Nijampatnam *et al.* 2020).

Her enzim, iki işlevsel alandan oluşur: bir karboksil-terminal glikan bağlayıcı alan (GBD), glikana bağlanma için bir alıcı görevi görür ve bir gtf tarafından üretilen glikanın türünü belirlemede önemlidir. Her enzimin amino-terminal katalitik alanı (CAT) sükroz substratını bağlar ve hidrolize eder (Rezaei *et al.* 2022).

Yüksek moleküler ağırlıklı polifenollerin, oolong çayının çürük önleyici özelliklerine ilişkin önceki bir çalışmada bölgeye özgü etkileri olduğu bulunmuştur; sonuç olarak, polimerik polifenoller bakımından zengin bir oolong çayı fraksiyonu, çözelti fazında gtf*B* ve gtf*D*'nin *S. mutans* glukan bağlayıcı alanlarını hedef alarak glukan sentezini rekabetçi olmayan bir şekilde inhibe etmiştir (Ma *et al.* 2021).

Bakteriyel hücrelerin uyumunu ve diş yüzeylerine yapışmasını geliştiren, yüksek yoğunluklu biyofilm üretimine izin veren bir matrisin inşası, gtf*B* ve gtf*C* tarafından glukanların eşzamanlı sentezine bağlıdır (Park *et al.* 2019).

2.4.3 *Streptococcus mutans*'ın sınıflandırılması

Nakano *et al.* (2009)'a göre *S. mutans* sınıflandırması çizelge 2.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1 *Streptococcus mutans*'ın sınıflandırılması

Etki Alanı	Bakteriler
Filum	Firmicutes
Sınıf	Coccus
Sipariş	Lactobacillales
Aile	Streptococcaceae
Cins	*Streptococcus*
Tür	*Streptococcus mutans*

2.4.4 *Streptococcus mutans*'ın virülans faktörleri

2.4.4.1 Diş yüzeyine yapışma

Çeşitli bakteri ve yüzey unsurlarını içeren karmaşık bir mekanizma *S. mutans*'a diş yüzeyine tutunma kapasitesi sağlar (Ranganathan and Akhila 2019). *S. mutans* anaerobik olduğundan ve oksijenin az olduğu veya hiç olmadığı durumlarda hayatta kalabildiğinden diş yüzeylerine özellikle de oklüzal diş yüzeyinde veya dişler arasında oluklara sahip olanlara tutunmak ve kolonize olmak için idealdir (Daboor *et al.* 2015).

Başlangıçta, oral streptokokların epitel hücrelerine tutunması için bir dizi yüzey bağlantısının gerekli olduğuna inanılıyordu. Plak, diş yüzeyini kolonize eden ve diş çürüklerine neden olan *S. mutans* da dahil olmak üzere çok sayıda bakteri kolonisinden oluşur (Mathew *et al.* 2020).

Bakterilerin diş yüzeyine tutunmasına neden olan süreçleri ve bakteriyel etkileşimlerin meydana gelmesine sebep olan unsurları anlamak çok önemlidir (Liu *et al.* 2016). In vitro araştırmalar, *S. mutans, S.sanguinis* ve *S.salivarius* gibi bakteri türlerinin, protein ve karbonhidratlardan oluşan hidroksiapatit filmlerle kaplanmış diş yüzeylerinin yanı sıra kaplanmamış diş yüzeylerindeki varlığını değerlendirmiştir (Alejandra and Daniel 2020).

Sonuçlar *S. mutans, S.sanguinis* ve *S.salivarius* bakterilerinin protein film kaplı ve kaplanmamış mine yüzeyleriyle etkileşimini incelediğinde bağlanma yeteneğinin

S.sanguinis'ten *S. mutans*'a göre belirgin şekilde azaldığını ve en iyi bağlanmanın *S.salivarius* tarafından gerçekleştirildiğini ortaya koymuştur. Bu bulgular *S.salivarius*'un diğer iki bakteriye kıyasla daha güçlü bir bağlanma potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir (Fernandes *et al.* 2018).

S. mutans tüm streptokok türleri arasında karbonhidrat hidroksiapatit filmine en etkili şekilde yapışmaktadır. Bakteriyel hücrelerin tutunmasıyla ilgili olarak, ağız biyolojisi alanında bir araştırmacı olan Tatevossian bir model sunmuştur (Tatevossian 2019). Bu hipoteze göre kalsiyum ve protamin fosfatın yanı sıra negatif yüklü bir partikül, *S. mutans* ve *S.sanguinis* hücreleri tarafından hidroksiapatit yüzeyine çekilmektedir. Fosfat ve florür etkileşimlerinin yanı sıra tükürük akışındaki azalma, bakteri hücrelerinin yüzeylere yapışmasını engelleyebilir (Aguayo *et al.* 2016). Sükrozun dış gelişiminde bulunan hidroksil grupları, *S. mutans* ve *S.sanguinis*'in ince tükürük proteini tabakası ile hidrojen bağlarının oluşmasına neden olan bir bağlantıya sahip olduğunu göstermiştir (Costa *et al.* 2017).

Pozitif yüklü iki iyon olan kalsiyum iyonunun varlığının, bakteri hücre duvarı ve tükürük proteininin yüzey yüklerindeki negatif yükler arasındaki etkileşimi güçlendirdiği gösterilmiştir (Zhu *et al.* 2021). Bu bulgular, bakteriyel hücrelerin yüzeylere bağlanması sürecinin, karşılaşma boyunca kalsiyum iyonları aracılığıyla kurulan bir köprü ile başlaması gerektiğini desteklemektedir (Chouirfa *et al.* 2019). Bakterilerin gelişimi, oral streptokok türlerinin birbirlerini etkileme kabiliyetlerinden ve ağız boşluğu ortamı arasındaki çeşitli bağlantıların etkileşimlerinden etkilenmiştir (Abranches *et al.* 2018).

2.4.4.2 Biyofilm oluşumu

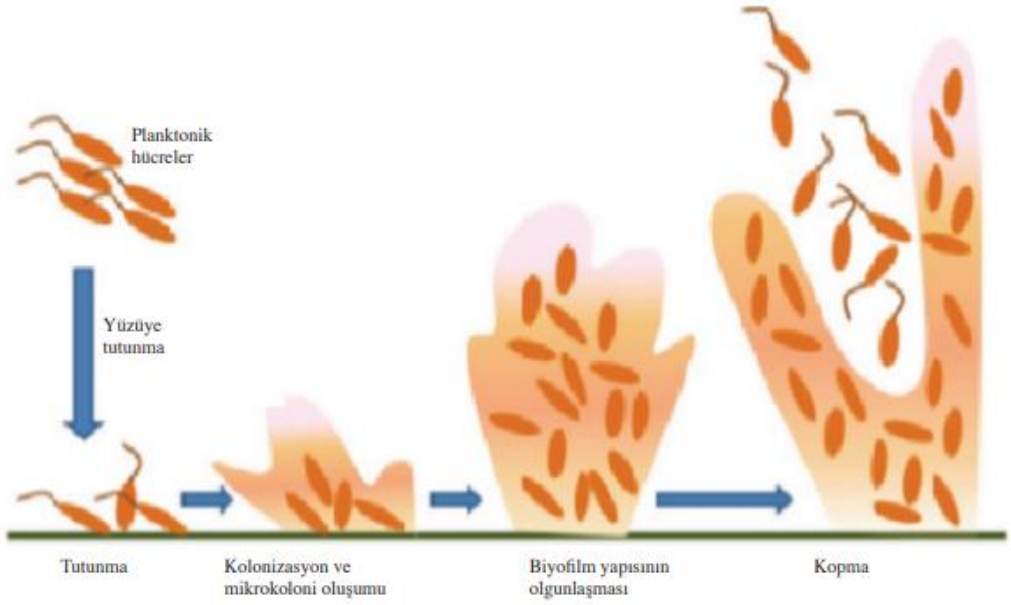
Diş yüzeylerinde oral biyofilm oluşumunda dört temel aşama vardır (Şekil 2.1). Oral bakterilerin diş yüzeylerindeki tükürük bileşenlerine, özellikle de öncü kolonizatörlere tutunmasıyla başlar. Erken kolonizatörler, kalıcı bağlanma gerçekleştiğinde diş yüzeyindeki yapışık bakterilere toplanır (Ren *et al.* 2016).

Bu hücreden hücreye kümelenme, diş yüzeyine yapışan hücrelerin yoğunluğunun yanı sıra yüksek konsantrasyonda hücre sinyal kimyasallarını da artırır. Hücre sinyal molekülleri olarak da bilinen bu çekirdek algılama molekülleri, hücrelerin bir biyofilm halinde birleşmesine neden olur (Selvaraj *et al.* 2015). Bir biyofilm oluşturmak için biyofilmin (Şekil 2.1) bir kısmı ve/veya bazı hücreleri ayrılabilir ve bu hücrelerin bazıları daha sonra başka bir yüzeyle yeniden birleşebilir (Gowrishankar *et al.* 2014).

Ağız bakterileri müsin, lizozim, amilaz ve prolinden zengin proteinler gibi diğer tükürük bileşenlerine sahip diş yüzeylerine yapışır. S.*gordonii, S.sanguinis, S.mitis, S.oralis* ve *Actinomyces* spp. gibi öncü kolonizatörler, sükroz yokluğunda diş yüzeyindeki tükürük bileşenlerine bağlanabilir. *S. mutans*, adhezinlerini kullanarak bu aşamada tükürük bileşenlerine doğrudan bağlanabilir (Bowen *et al.* 2018).

S. mutans ve *Capnocytophaga ochracea*, *Influenza* türleri ve *Veilonella* türleri ile paraleldir. Bakteriler daha önce ilişkili bakterilerin yakınında toplanmaktadır ve bir enfeksiyona neden olmaktadır (Alejandra ve Daniel 2020). *S. mutans*, sükroz varlığında Gtf'leri sentezler ve bu Gtf'ler glukan üretir (Ren *et al.* 2016b).

Gtf'ler tükürük bileşenlerine yapışabildiğinden ve çözünmeyen glukan Gbps'ye bağlanabildiğinden, her ikisi de *S. mutans*'ın yüzeylere tutunmasına ve diğer oral bakterilerle birlikte toplanmasına yardımcı olur (Krzysciak *et al.* 2014). Diğer *Capnocytophaga* spp., *Actinomyces* spp., *Fusobacterium nucleatum, Prevotella intermedia* ve *Porphyromonas gingivalis* gibi diğer oral bakteriler, birincil kolonizörler ve erken kolonizörler diş yüzeyine sıkıca tutunduktan sonra yapışabilir (Mathew *et al.* 2020).



Şekil 2.1 Oral biyofilm oluşumu (Banerjee *et al.* 2020)

2.4.4.3 Mutasinler

Yeni antibakteriyel bileşiklerin oluşturulması, antibiyotiklere karşı bakteriyel dirençteki artıştan kaynaklanmaktadır (Lencina *et al.* 2018). Mutasinler (bakteriyosinler) olarak bilinen küçük antibakteriyel peptitler, *S. mutans* tarafından üretilir ve bakteriyel enfeksiyonlara karşı aktiviteye sahiptir (Mocan *et al.* 2017, Al-Shahrani 2019).

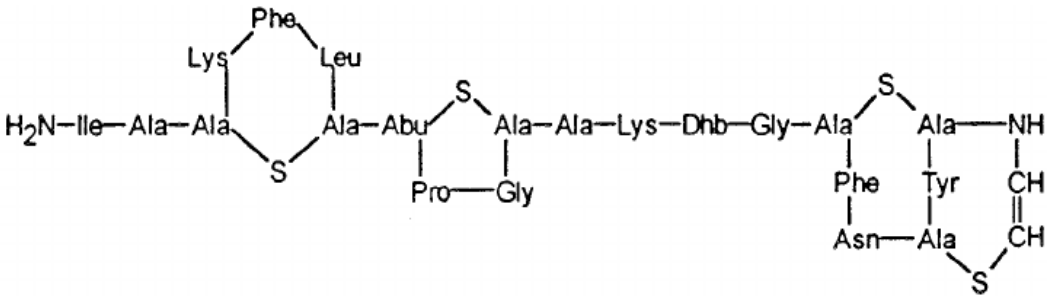
Bakteriyosinler, ribozomlar tarafından N-terminalinde salgılanan proteinlere özgü bir sinyal peptidi bulunan ve olgun peptidin membrandan ihracıyla eş zamanlı olarak bölünen öncü peptitler olarak üretilir (Bowen *et al.* 2018, Dhumal *et al.*, 2022). Genel olarak bakteriyel büyümenin log fazından durağan faza geçişi veya kültür ortamındaki hücre yoğunluğu, gram-pozitif bakteriler tarafından bakteriyosinlerin sentezi ile ilgilidir (Lescure *et al.* 2018).

Oral bakteri *S. mutans* iki tip bakteriyosin üretir: (i) I lantiyonin içeren (lantibiyotik) mutasinler ve (ii) modifiye edilmemiş mutasinler (Kidd ve Fejerskov 2016, Watanabe *et al.* 2021). Bugüne kadar birçok iki bileşenli lantibiyotik ve nonlantibiyotik bakteriyosin bildirilmiştir. Çoğu zaman karakterize edilen bu bakteriyosinlerin aktiviteleri, tam

antimikrobiyal etkinliklerini göstermek için iki polipeptidin bir arada hareket etmesine bağlıdır (Nicolas *et al.* 2011) . Özetle çoğu bakteriyosinin, tek bir aktif polipeptit yerine iki polipeptidin sinerjistik etkileşimi sonucunda tam etkinliğe sahip olduğunu göstermektedir (Lee *et al.* 2019).

Ribozomlar tarafından yapılan ve translasyondan sonra değişen kısa peptitler olan lantibiyotikler, lantionina, -methyllantionina dehidratados kalıntıları içerir (de Souza *et al.* 2020). *S. mutans* bakteriyosinlerini moleküler ağırlıklarına ve ısıya duyarlılıklarına göre iki kategoriye ayrılmıştır (Salehizadeh *et al.* 2016). İkinci grup küçük moleküllerden (10.000 Da'dan fazla) oluşmakta olup ve 20 dk boyunca 80C°'de ısıtıldığında inaktive olan ilk grubun aksine ısıya dayanıklıdır (Heikenfeld *et al.* 2019). Ancak aynı grup içinde bile aktivite aralığı, kloroform veya tripsine duyarlılık gibi faktörler büyük ölçüde değişiklik gösterebilir (Wang *et al.* 2019b, Yang *et al.* 2021, Hu *et al.* 2022).

Posttranslasyonel modifikasyonlarına dayanara gram-pozitif bakteriler tarafından üretilen 'bakteriyosinler' olarak bilinen peptit antibiyotikler, *S. mutans*'ta sınıf I (lantibiyotikler) veya sınıf II (antibiyotik olmayanlar) olarak kategorize edilmektedir (Acedo *et al.* 2018). Antibiyotik olmayan mutasinler, özellikle mitis grubu streptokoklar ve A grubu streptokoklar gibi yakından ilişkili streptokok türlerine karşı daha spesifik bir etkiye sahiptir. Öte yandan, şekil 2.2'de gösterilen lantibiyotik mutasinler, Gram-pozitif bakteriler arasında çoklu ilaca dirençli patojenler dahil olmak üzere geniş bir aktivite spektrumuna sahiptir (Papadimitriou *et al.* 2016, Salvadori *et al.* 2019, Naraki *et al.* 2020).



Şekil 2.2 Lantibiyotik mutasinin kimyasal yapısı

2.4.4.4 Ekzoenzimler

Streptococcus mutans tarafından üretilen çok sayıda ekzoenzim, hücre dışı sükroz metabolizmasında yer alır. Bu enzimler arasında iyi bilinen glukoziltransferazlar I, SI ve S. fruktanaz, fruktoziltransferaz ve dekstranaz bulunur. Ayrıca, sagA olarak da bilinen *gbpB* geni tarafından kodlanan varsayılan peptidoglikan hidrolaz, hücre duvarlarının bütünlüğünü korumak için büyük öneme sahiptir (Costa *et al.* 2021).

S. mutans glukoziltransferazlar (gtf*s*), tehlikeli diş plağının büyümesi için gereklidir. Gtfs, mine üreten in-situ glukanlara adsorbe olarak mikrobiyal kolonizasyon için alanlar ve plak için çözünmez bir matris sağlar (Zhang *et al.* 2021). Diğer ağız mikroplarının yüzeyleri de gtf'leri alarak onları glukan yapıcılara dönüştürür *S. mutans* genetik olarak farklı üç gtf (glukoziltransferaz) enzimi ifade eder. Her bir gtf'nin virülan plak gelişiminde örtüşen ancak ayrı bir işlevi olduğu görülmektedir (Matsumoto-Nakano 2018).

Gtf*B* bakterilere agresif bir şekilde bağlanarak sıkı hücre kümelenmesine neden olur ve plak yapışkanlığını artırırken, gtf*C* pelikül içindeki mineye adsorbe edilir. gtf*D*, çözünebilir, kolayca metabolize edilebilir bir polisakkarit oluşturarak gtf*B* için bir primer görevi görür (Klein *et al.* 2015). Gtf*BC* lokusuna bağlı olmayan gtf*D* geni, suda çözünebilen bir glukanın sentezini katalize eden bir enzimi kodlar. gtf*B* ve gtf*C* genleri operon benzeri bir düzende yer alır ve esas olarak suda çözünmeyen glukanlar oluşturan enzimleri kodlar (Sims 2019).

Gtf*BC* tarafından üretilen suda çözünmeyen glukanlar, organizmaların diş yüzeylerine yapışması ve birikmesinin yanı sıra dental biyofilmlerin yapısal bütünlüğünü korumaktan sorumlu olan hücre dışı polisakkarit matrisinin oluşturulmasında çok önemlidir (Shafiei *et al.* 2020).

2.5 Diş Çürükleri

Diş hastalıkları 2015 yılında 544,41 milyar dolarlık bir küresel ekonomik yüke neden olmuştur. (Righolt *et al.* 2018, Rosing *et al.* 2022). Diş sorunları, vakaların %79'unda ciddi diş kaybı ve tedavi edilmemiş diş çürüklerinden kaynaklanmaktadır (Fernandes *et al.* 2020). Diş çürüğü son zamanlarda her zamankinden daha sık görülmekte hatta çoğu ülkede en yaygın kronik durum olarak kabul edilmektedir.

Daimi diş çürükleri en yüksek küresel prevalansa sahip hastalıktır (Vos *et al.* 2017, GBD *et al.* 2017). Gelişmiş ülkelerde diş çürüğü prevalansının yüksek olduğu tespit edilmiştir. Örneğin, 2003 yılında Birleşik Krallık'ta 5-15 yaş arasındaki çocukların %55-72'sinde diş çürüğü bulunmaktadır (Yazdi *et al.* 2018). ABD'de 2009 yılında diş çürükleri 5-17 yaş arası çocuklarda astıma kıyasla beş kat daha yaygın olup 2011-2012 yıllarında diş çürükleri 12-19 yaş arası her beş ergenden yaklaşık üçünü etkilemektedir (George *et al.* 2015, Gisriel *et al.* 2022).

Diş çürüğü, ağız boşluğunda bakteriyel fermantasyonun ürettiği asidin sert diş dokusunu tahrip etmesi olarak da tanımlanmaktadır (Veiga *et al.* 2016).

Çürük gelişimi, bakteriyel biyofilm içinde başlayan ve kaviteli veya kavitesiz olabilen bir çürük lezyonuna neden olan sert diş dokusunun demineralizasyonunun bir sürekliliğidir. Çürük ilerlerse şiddetli diş ağrısına ve/veya diş kaybına neden olabilir (Machiulskiene *et al.* 2020).

Bir kişinin ilk yaşlarında dişleri çıktığında, diş çürüğü onu hayatının geri kalanında etkileyen patojenik bir durumdur. Karyojenik bakteriler, tükürük akışı, florür etkisi, ağız hijyeni uygulamaları ve diyetle alınan şeker tüketimi gibi çok sayıda faktörün de etkisi vardır (Prados-Privado *et al.* 2020).

Diş çürükleri, sert diş dokusunu demineralize eden diyet karbonhidratlarının oral bakteriyel fermantasyonunun asidik yan ürünlerinden kaynaklanır (Lamont *et al.* 2018).

Oral biyofilmlerin diş yüzeyinde oluşması için yeterli zaman verildiğinde çürük süreci başlar. Çoğunluğu streptokok olan laktik asit bakterileri, diş yüzeyindeki biyofilm yapısı içinde diyet karbonhidrat fermantasyonunun bir yan ürünü olarak asit oluşturur (Deglovic *et al.* 2022).

Bu asit, pH seviyelerinin önemli bir seviyenin altına düşmesine neden olarak diş minesini demineralize eder. Bu demineralizasyon nedeniyle kalsiyum, fosfat ve florür dişin hidroksiapatitine yayılır. Bu demineralizasyonun devam etmesine izin verilirse çürük lezyonu oluşacaktır (Kidd and Fejerskov 2016).

Diş yüzeyinin demineralizasyonu diş çürüğü için risk faktörlerinden biridir. Karyojenik bakteriler ilk unsurdur (Rathee and Sapra 2019). *Streptococcus*, *Lactobacillus* ve *Fusobacterium* dahil olmak üzere bu bakteriler biyofilmlerin gelişmesine ve/veya asitlerin oluşmasına aracılık eder. İkinci bileşen, biyofilm yapısının substratı olarak hizmet eden bir diyet şekeridir (Reddy *et al.* 2020).

Oral biyofilmlerin önemli bir bileşeni olan glukan sentezini katalize eden glukoziltransferazlar, substrat olarak sükroz kullanır (Jakubovics *et al.* 2021). Bu nedenle, uygun ağız hijyeni uygulamaları ağız boşluğundaki karyojenik bakterileri azaltabilir ve diş yüzeyindeki biyofilm sayısını düşürebilir. Tükürük akışı üçüncü faktördür. Ağızdaki pH'ı yükselterek diş yüzeyindeki demineralizasyonu azaltır (Li *et al.* 2020).

Ek olarak, insan genetiğinin diş çürüğünde bir rolü olabileceği keşfedilmiştir (Chapple *et al.* 2017). Mine gelişimi geni (AMELX), immünolojik yanıt (DEFB1), tükürük tampon kapasitesi ile ilgili tükürük bileşeni (CA6) ve bir tat reseptörü (TAS2R38) dahil olmak üzere çok sayıda gen diş çürüğü ile bağlantılı olabilir (Yıldız *et al.* 2016). Her bireyin ağız mikrobiyomu farklıdır ve diş sağlığının korunması için gereklidir. Sonuç olarak bir bireyin diş çürüğü riski ağız florasına bağlıdır (Tanner *et al.* 2018).

2.5.1 Diş çürüklerini etkileyen risk faktörleri

2.5.1.1 Irk veya Etnik Grup

Bazı ırklarda yüksek düzeyde çürük direnci mevcuttur. Bu fikirler artık verilerle desteklenmemektedir; bu da eşitsizliklerin doğuştan gelen ırksal özelliklerden ziyade çevresel koşulların bir sonucu olduğunu göstermektedir (Vial *et al.* 2016). Avrupalı olmayan Afrika ve Asya ırkları, Avrupalılara kıyasla daha az diş çürümesine sahiptir. Ayrıca, bazı bireyler farklı bir kültürel ve beslenme düzenine sahip bir bölgeye göç ettiklerinde, daha önce dirençli oldukları varsayılırken çürüğe duyarlı hale gelmişlerdir (Abdulhussein 2018).

Çok sayıda epidemiyolojik araştırma, ırk veya etnik kökenin çürük üzerinde etkisi olduğunu ortaya koymuştur. Siyahların beyazlara göre daha yüksek oranlarda ve daha şiddetli diş çürüğü yaşadığını bilinmektedir (Crenshaw 2017, Sivapathasundharam and Raghu 2020).

2.5.1.2 Yaş

Yaş, çocuk hastalıklarına etkileyen unsurlardan biridir. Çürük, şiddetli bir şekilde yaşandığında genellikle erken yaşlarda başlar ve gençler arasında bu durum daha yaygındır. Zamanla çürük daha da ilerleyerek hayat boyu süren bir durum haline gelebilir. (Pitts *et al.* 2017).

Diş çürüğü prevalansı her yaştan insan arasında farklılık göstermektedir (Abdulhussein 2018). Süt dişlerindeki diş çürüklerinin altı yaşına kadar arttığı gözlenmiş, ancak sonraki yıllarda hastalıkta bir düşüş kaydedilmiştir.

Giacaman *et al.* (2018)'nın çalışmasında, yaş ile diş çürükleri arasında önemli bir ilişki olduğu, kavitasyona neden olan çürük lezyonlarının tedavi edilemez olduğu ve bu nedenle yaşla birlikte biriktiği sonucuna varılmıştır.

2.5.1.3 Cinsiyet

Çürük oranları, kadınlarda erkeklere göre daha yüksektir (Lipsky *et al.* 2021). Tükürük bileşimi ve akış hızındaki farklılıklar, vücutlarındaki hormonal değişiklikler, beslenme tercihleri, genetik varyans ve ailelerindeki özel sosyal roller nedeniyle kadınlarda çürük oluşma olasılığının daha yüksek olduğu bilinmektedir (Mamai-Homata *et al.* 2016). Kadınların genellikle erkeklerden daha yüksek prevalans oranları gösterdiği görülmektedir (Shaffer *et al.* 2015).

Kadınlarda çürük oranları erkeklerden yaklaşık iki kat daha yüksektir (Saura *et al.* 2017). Schenkel *et al.* (2022)'na göre, cinsiyete bağlı kalıtım modelleri sergileyen cinsiyet kromozomlarının, erkeklere kıyasla kadınlarda daha yüksek çürük oluşumuna katkıların kaynağı olabilir.

2.5.1.4 Beslenme

Beslenmenin dişler üzerindeki en önemli etkisi, ağızdaki gıdaların neden olduğu diş çürüklerinin gelişimidir (Jevtić *et al.* 2015). Mine, dentin ve sementum, belirli karyojenik mikroorganizmalar nedeniyle kademeli olarak bozulur. Ağız bakterileri, şeker ve diğer diyet karbonhidratlarını fermente etmek için yakıt kaynağı olarak kullanır ve yan ürün olarak laktik asit üreterek buna karşı savunmasız olan diş yüzeylerini demineralize edebilir (Lemos *et al.* 2019).

Kişinin yaşamı boyunca tükettiği gıda ve besin maddelerinin miktarının hem sağlık düzeyi hem de ağız boşluğu hastalıkları da dahil olmak üzere çok çeşitli hastalıklara yatkınlık üzerinde önemli bir etkisi olduğu giderek daha açık hale gelmektedir (Zmora *et al.* 2019). Çocukluk çağı beslenmesinin çocuk sağlığı için oldukça önemli olduğu bilinmektedir (Bhattacharya *et al.* 2016).

Florür

Dişleri etkileyen bir diğer bileşen de diş çürüklerini durdurmak ve kontrol altına almak için çok önemli olan florürdür. Dşçilik tarihindeki en önemli dönüm noktalarından biri florürün antikaryojenik yeteneklerinin keşfedilmesidir (Jepsen *et al.* 2017).

Dünya Ağız Sağlığı Raporu (2003)'na göre düşük seviyelerde sürekli olarak ağız boşluğunda florür bulundurmak, diş çürüklerini önleme konusunda en etkili yöntemdir (Petersen and Ogawa 2016). Florürler gargaradan, diş macunundan, profesyonel olarak uygulanan florürlerden veya diğer kaynaklardan gelebilir (Do *et al.* 2020). Florürlü diş macunu kullanılırken florür dişlerin yüzeyine uygulandığı için diş çürüğüne yatkınlığı azaltmaktadır (Horst *et al.* 2018).

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Çalışma Dizaynı

Kasım başından Aralık 2022 sonuna kadar olan dönemde Al-Numan Hastanesi, Al-Banouks Hastanesi, İmam Ali Hastanesi, Asur Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi ve Özel kliniklerde farklı yaşlardaki hastalardan hem sağlıklı (n=60) hem de hasta (n=60) bireylerden uzman bir doktor gözetiminde toplam 120 sürüntü örneği alınmıştır.

3.2 Örneklerin Toplanması

Örnekler (sürüntüler), steril bir fırçayla alınarak, taşıma için ortam içeren bir tüpe yerleştirilmiştir. Daha sonra laboratuvarda uygun kültür ortamına sürüntülerin yerleştirilmesi ve tanı testlerinin yapılması için işlemler gerçekleştirilmiştir.

3.3 Materyaller

3.3.1 Ekipman ve aparatlar

Bu çalışmada kullanılan cihaz ve araçlar çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1 Cihazlar ve araçlar

NO.	Cihazlar ve Araçlar	Şirket	Menşei
1	Otoklav	Hirayama	Japonya
2	Bunsen brülörü	Memmert	Kore
3	Santrifüj	Fisher scientific	ABD
4	Bileşik ışık mikroskobu	Olympus	İspanya
5	Distillatar	Memmert	Almanya
6	ELISA okuyucu	Kevin	Almanya
7	Filtre kağıdı	Sartorius	Almanya
8	İnkübatör	Memmert	Almanya
9	Aşılama döngüsü	John Bolton	Birleşik Krallık
10	Ocak plakalı manyetik karıştırıcı	FALC	İtalya
11	Mikrotitre 96 düz tabanlı kuyucuklar	Coastar	ABD
12	Mikrodalga fırın	Gosonic	Çin
13	Düz Tüp	AFCO	Ürdün
14	Buzdolabı	TEKA	İspanya
15	Hassas denge	Memmert	ABD
16	Steril Petri kapları	AFCO	Ürdün
17	Steril sürüntü çubuğu	Sterellin ltd.	Birleşik Krallık
18	Steril şırıngalar	Hagg	BAE
19	Vitek 2	BioMerieux.	Fransa

3.3.2 Kimyasal ve biyolojik malzemeler

Bu çalışmada kullanılan kimyasallar ve biyolojik araçlar çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2 Kimyasal ve biyolojik malzemeler

NO.	Kimyasal ve biyolojik malzemeler	Şirket	Menşei
1	Katalaz reaktifi:	BHD	İngiltere
2	3 Hidrojen peroksit (H2O2)	BDH	İngiltere
3	Gliserol	Himedia	Hindistan
4	Gram Boyası	Kan Bankası	Bakuba

3.3.3 Kültür ortamı

Kültür ortamları, çizelge 3.3'teki protokollere göre hazırlanmıştır.

Çizelge 3.3 Kültür ortamı

NO.	Ortam	Şirket	Menşei
1	Kanlı agar bazı	Mast group	UK
2	Beyin kalp infüzyon suyu	Mast group	UK
3	Mueller Hinton agar	Himedia	India
4	Mitis Salivarius Basitrasin agar (MSBA)	Himedia	India
5	Mitis Salivarius agar (MSA)	Himedia	India

3.3.4 Antimikrobiyal ajanlar

Çalışma süresince çizelge 3.4'te gösterilen antimikrobiyal ajanlar Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (2022)'ne göre kullanılmıştır.

Çizelge 3.4 Antimikrobiyal disk

Antimikrobiyal disk	Sym	Disc Con (µg/ml)	Antimikrobiyal disk (mm)			Şirket (menşei)
			Dirençli	Orta	Hassas	
Amikasin	AK	30	≤12	13_14	≥ 15	Bioanalyse
Aztreonam	AT	30	≤15	16_18	≥19	(Türkiye)
Sülfametoksazol ve trimetoprim	SXT	30	≤14	15_17	≥18	Bioanalyse
Seftazidim	CAZ	30	≤14	15_17	≥18	(Türkiye)
Siprofloksasin	CIP	5	≤25	19_24	≥18	Bioanalyse
Gentamisin	GM	10	≤12	13_14	≥15	(Türkiye)
İmipenem	IPM	10	≤12	13_14	≥15	Bioanalyse
Levofloksasin	LEV	5	≤22	15_21	≥14	(Türkiye)
Meropenem	MEM	10	≤14	15_16	≥17	Bioanalyse
Amoksisilin/klavulanik asit	AUG	10	≤25	19_24	≥18	(Türkiye)
Sefotaksim	CTX	30	≤14	15_17	≥18	Bioanalyse
Ceftriaxone	CRO	10	≤14	15_16	≥17	(Türkiye)

3.3.5 Kitler

Mevcut çalışmada kullanılan kitler aşağıda verilmiştir (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.5 Kitler

NO.	Kitler	Şirket	Menşei
1	DNA Ladder	Promega	ABD
2	Etidyum bromür çözeltisi (10mg/ml), GoTag Green Master Mix, Nükleaz içermeyen su, TAE10X, Quantifluor dsDNA sistemi	Promega	ABD
3	GN kimlik kartı (VITEK2)	BioMerieux	Fransa
4	Gram boyama kiti	BHD	İngiltere
5	Presto™ Mini gDNA Bakteri Kiti	Genaid	Tayvan
6	Astarlar	Macrogen	Kore

3.3.6 Primerler

Bu çalışmada kullanılan primerler (Macrogen, Kore) aşağıda verilmiştir (Çizelge 3.6).

Çizelge 3.6 Çalışmada kullanılan primer dizileri

Primer Adı	Dizilimi (5' - 3')	Boyut (bp)
GTF*D-F* **GTF*D-R***	(GGTAACCATTGCTGTCGCTTC) (GATGCCGCCTTATCATCCTCA)	135
16S rRNA-F ***16S rRNA-R***	(GCTCTCTGGTCTGTCACTGAC) (GCGGAGTGCTTATTGCGTTAG)	150

3.4 Metodlar

3.4.1 Sterilizasyon yöntemleri

Farklı besiyerleri nemli ısı sterilizasyon tekniği kullanılarak otoklavda 121°C'de ve 15 bar/pound basınçta 15 dk süreyle sterilize edilmiştir. Yüksek sıcaklıklardan zarar görebilecek antibiyotik solüsyonlarını ve bitki ekstraktlarını sterilize etmek için millipore filtreler (0,22 m) kullanılmıştır. Herhangi bir kontaminasyonu önlemek için tüm cam malzemeler 160°C'de 1,5-2 saat boyunca mikrodalga fırında kuru ısı ile sterilize edilmiştir (Murray 2021).

3.4.1 Çözeltilerin ve reaktiflerin hazırlanması

Deneyde kullanılan reaktifler, çözeltiler ve pigmentler, üretici protokollerine göre hazırlanmıştır. Otoklavda 121°C'de ve 15 libre basınçta 15 dk sterilize edilmiştir. Cam aletler, sterilize etmek için 180°C'de 2 saat boyunca elektrikli fırında ısıtılarak kurutulmuştur.

3.4.1.1 Normal tuzlu su çözeltisi

Çözelti, 0.85gr sodyum klorürün 90 ml damıtılmış suya eklenmesiyle oluşturulmuştur. Toplam hacim 100 mL olacak şekilde ayarlanmıştır, pH değeri 7.1'e ayarlanmıştır ve sterilize etmek için otoklavlanmıştır. Çözelti kullanılana kadar 4°C'de saklanmıştır.

3.4.1.2 McFarland bulanıklık standardı

Üretici (Biomeriex) tarafından hazırlanan çözelti, bakteri miktarını kalibre etmek amacıyla kullanılarak yaklaşık olarak 1.5 x 108 CFU/ml bakteri hücresi elde edilmiştir.

3.4.1.3 Antibiyotik stok çözeltileri

Antibakteriyel ilaç standart çözeltisi, birincil stok olarak 1000 g/ml nihai konsantrasyonda oluşturulmuştur. 1 g antibiyotik 10 ml'de çözülerek hacim 100 ml'ye tamamlanmış, ardından 0,32 m gözenek boyutuna sahip filtrelerle sterilize edilmiş ve buzdolabında saklanmıştır. Daha sonra, stok 2 (1000 g/ml), 1000 g/ml'lik birincil stoktan C1V1=C2V2 formülü kullanılarak oluşturulmuştur (Weinstein and Lewis 2020).

3.4.1.4 Basitrasin çözeltisinin hazırlanması

0,347 g antifungal tozu 100 ml millipore filtreden geçirilmiş deiyonize su ile karıştırarak basitrasin stoğu hazırlanmıştır. Buzdolabında iki ila üç hafta boyunca saklanmıştır (Yoo *et al.* 2005).

3.4.1.5 Tris-Asetat EDTA tamponu

En sık kullanılan agaroz DNA elektroforezi tamponu olan Tris asetat EDTA Tamponu 10X (TAE-10X), asetik asit, Tris bazı ve EDTA'yı içerir. Uygulanabilir bir 1X TAE çözeltisi, 200 ml TAE (10X) ile 800 ml damıtılmış su karıştırılarak oluşturulmuştur.

3.4.1.6 Etidyum bromür (10mg/mL)

Bu boyalar Promega-USA'dan 10 mg/ml konsantrasyonda kullanıma hazır olarak temin edilmiştir.

3.4.1.7 Katalaz test reaktifi

Reaktif %3 H_2O_2 çözeltisi içermektedir.

3.4.1.8 Gram boyama çözeltisi

Bu boya bakterilerin mikroskobik özelliklerini gözlemlemek ve onları gram-pozitif ve negatif bakteriler olarak sınıflandırmak için kullanılmıştır. Gram boyama çözeltisi, safranin, kristal menekşe pigmenti, %100 alkol ve iyot çözeltisinden oluşmaktadır (Mac Fadden 2000).

3.4.2 Kültür ortamının hazırlanması

Çizelge 3.3'te görülen saf kültür, protokole uygun olarak yapılmış ve pH 7'ye sabitlenmiş, ardından 121°C'de 15 pound/inc^2'de 15 dk boyunca otoklav ile sterilize edilmiş, 37°C'de 24 saat boyunca inkübe edilmiş ve kullanılana kadar 4°C'de buzdolabında muhafaza edilmiştir.

3.4.2.1 Kanlı agar besiyeri

Besiyeri, protokole uygun olarak hazırlanmıştır. Otoklavlama yöntemiyle 121°C'de 15 pound basınçla 15 dk boyunca sterilize edilmiştir. Ardından, 45-55°C'ye soğutulmuş ve %5 erkek kan grubu AB eklenerek tamamlanmıştır. Bu besiyeri, izolatların hemolizin üretme kapasitesini test etmek için kullanılmıştır.

3.4.2.2 Mitis Salivarius agar (MSA)

İnülin, sorbitol, mannitol ve sakkaroz şekerleri 10 mg şekerin 100 ml distile suda çözülmesiyle hazırlanmış ve daha sonra filtre kağıdı kullanılarak sterilize edilmiş ve mannitol şekerinde olduğu gibi şekerlerin fermantasyonu test edilmiş, ayrıca bakterilerin hızlı teşhisinde kullanılmıştır (Atlas and Snyder 2006).

3.4.2.3 Mitis Salivarius Bacitracin agar (MSBA)

Besiyeri, 7,5 g MSA besiyeri ve 4 g sukrozun 250 ml distile suda çözülmesi ve 121°C'de15dk otoklavlanarak sterilize edilmesi ve bacitracin solüsyonu eklenmeden önce 40°C'ye soğumaya bırakılması ve sterilize edilmiş plaklara dökülmesi ile hazırlanmıştır. *S. mutans* bu besiyeri kullanılarak büyütülmüş ve izole edilmiştir (Yoo *et al.* 2005).

3.4.2.4 Muller Hinton agar

Besiyeri protokole uygun olarak hazırlanmış, otoklavda sterilize edilmiş, soğutulmuş ve steril plakalara yerleştirilmiş, ardından kullanılana kadar buzdolabında saklanmıştır (Mac Fadden 2000).

3.4.2.5 Basitrasin çözeltisi

Belirtilen protokole göre, bacitrasin çözeltisi yeni bir çözelti elde etmek için 0.354 gr bacitrasin ve 100 ml damıtılmış suyla birleştirilmiştir. Karışım iyice karıştırıldıktan sonra süzgeç kullanılarak sterilize edilmiştir.

3.4.2.6 Beyin kalp infüzyon suyu

Besiyeri, protokole göre 35 gr tartılıp ve 1000 ml distile su içinde çözülerek hazırlanmıştır. pH değeri 7.4 olarak ayarlanmıştır ve tamamen çözünene kadar kaynatılmıştır.

Bakteriyolojik tanımlama

3.4.2.7 Örneklerin kültüre edilmesi ve koloni özellikleri

İzolatlar kültür ortamına inoküle edilmiş ve 37°C'de 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Değerlendirilen koloni özellikleri arasında koloni dokusu, rengi, kenarları ve şeklinin yanı sıra kanlı agar ortamında kırmızı kan hücrelerini parçalama yeteneği de yer almıştır

3.4.2.8 Mikroskobik inceleme

Gelişmekte olan bakteri izolatları, steril bir aşılama halkası kullanılarak genç bir koloniden bir örnek aktarılarak, temiz bir cam lamın yüzeyine bir damla damıtılmış su ile karıştırılarak, yayılarak, kurumaya bırakılarak ve Bunsen brülöründe ısı ile sabitlenerek mikroskobik olarak incelenmiştir. Son olarak, örnekler gram boyama yöntemi kullanılarak boyanmış ve hücrelerin şeklini görmek için bileşik ışık mikroskobu (100x) altında incelenmiştir.

3.4.2.9 Biyokimyasal test

Bakteriyel izolatları tespit etmek için biyokimyasal testler yapılmıştır.

Katalaz testi

Kolonilerden alınan bir örnek %3'lük H_2O_2 çözeltisinden bir damla ile karıştırılmış ve test için temiz bir cam lam üzerine konulmuştur (Léger *et al.* 2019). Gaz kabarcıklarının ortaya çıkması istenilen bir sonuçtur. Bu testin amacı, izolatların 10 sn içinde H_2O_2'den oksijen gazının salınmasını sağlayan bir enzim olan katalaz oluşturma yeteneklerini incelemektir.

3.4.3 VITEK 2 Compact Sistemi ile izolatların teşhisi

VITEK 2 sistemi, bakteriyel teşhis için kullanıldığında (Hernández Durán *et al*. 2017) oldukça doğru sonuçlar vermiştir. Bu sistem, 64 biyokimyasal test ve bir antibiyotik duyarlılık testi içermektedir. Büyümeye dayalı VITEK 2 Compact sistemi, otomatik bir mikrobiyolojik sistemdir. Hem Gram negatif hem de Gram pozitif bakterilerin tanısının doğrulanması için VITEK 2 kullanılır ve inkübe edilen ve yorumlanan renkli reaktif kartlarla ayırt edicidir.

3.4.4 Tanımlanmış suşların korunması

3.4.4.1 Kısa süreli koruma

Slant tekniği kullanılarak nutrient agar üzerinde tanımlandıktan sonra bakteri izolatları inoküle edilmiştir. Tüpler 37°C'de 24 saat inkübe edildikten sonra günlük kullanım için 4°C'de muhafaza edilmiştir. İzolatlar her ay besleyici stok besiyerinde aktive edilerek yenilenmiş ve aktif olmaya devam etmeleri için eğimli bir besiyerine yeniden ekilmeleri gerekmiştir.

3.4.4.2 Uzun süreli koruma

Süreç, izole edilen bakterilerin %20 gliserol içeren besiyerlerinde yetiştirilmesini içermektedir. Besiyeri, 2 ml gliserol ile 8 ml beyin kalp infüzyon suyu karıştırılarak hazırlanmıştır.

Daha sonra şişeye konmuş ve sterilize etmek için otoklavlanmıştır. Tüpler 37°C'de 24 saat boyunca inokulum olarak saf bir koloni ile inkübe edilmeden önce soğumaya bırakılmıştır. Tüpler son olarak derin dondurucuda saklanmıştır.

3.4.5 Biyofilm oluşumu

Biofilm gelişiminin belirlenmesi için mikrotiter plaka testi kullanılmıştır (Almeida *et al.* 2013). 24 saat boyunca, bakteriler besin çözeltisi ortamına 37°C'de inoküle edilmiştir. Ardından, aynı ortamı seyreltici olarak kullanarak, besin çözeltileri MacFarland standart No. 0.5'e göre karşılaştırılmıştır.

96 kuyucuklu düz tabanlı bir polistiren plaka kullanılmış ve her kuyucuğa 200 L izolat süspansiyonu konulmuş ve ardından 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Distile su ile üç tur yıkama ve şiddetli çalkalamanın ardından her bir kuyu uygun şekilde kurutulmuştur. Yapışan bakteri hücrelerini sabitlemek için 200 L saf metanol kullanılmıştır. Bunu takiben, her bir kuyucuğu 15 dakika boyunca boyamak için 200 L %0,5'lik kristal viyole kullanılmıştır.

Fazla boya tekrarlanan yıkama ile uzaklaştırılmıştır. Sonrasında, yapışık hücrelere tutunmuş olan kristal violetin korunması için her bir kuyucuğa 200 µl etanol eklenmiştir. Test üç kez gerçekleştirilmiş ve mikroorganizma içermeyen besin suyu içeren kuyucukların absorbansı ters kontrol olarak kullanılmıştır.

Her bir kuyucukta %95 etanol tarafından elimine edilen kristal viyole miktarı, OD 630 nm'nin bir ELISA okuyucu ile ölçülmesiyle belirlenmiştir.

İyi çalışılmış izolatlar tarafından mikrotitre yüzeyinde üretilen biyofilmin yoğunluğu bu nedenle absorbans değerleri ile gösterilmiştir. Sonuçlardan üç kategori oluşturulmuştur (biyofilm üretmeyen, orta derecede ve güçlü biyofilm üreten).

3.4.6 Antibiyotik duyarlılık testi

Duyarlılık testi prosedürü CLSI, 2021'e göre aşağıdaki adımlar doğrultusunda gerçekleştirilmiştir:

1-Mueller- Hinton agar plakları Kirby-Bauer yönteminde hızlı büyüyen türlerin kullanımı için kullanılmıştır. Plakalarda çözücü sterildir ve yaklaşık 4 mm derinliğe sahiptir.

2- Saf kültür inokulum olarak kullanılmıştır; 2-4 ilgili koloni seçildi ve yaklaşık 5 ml standart steril tuzlu suya aktarılmıştır. Ortalama 1.5x 10 CFU/ml'ye eşit bir sayı elde etmek için mikrobiyal süspansiyonun bulanıklığı McFarland Standardı 0.5'in bulanıklığı ile karşılaştırılmıştır.

3-Standart inokuluma batırılan steril pamuklu çubuk, çubukla plağın tüm agar yüzeyine 3 kez streçleme yapılmış, her çizgi arasında plak 50 derecede döndürülmüştür. İnokulum bir kapakla 5-10 dk kurumaya bırakılmış ve antibiyotikler (Çizelge 3.4) plakalara dağıtılmıştır.

4-Plaklar daha sonra 37°C'de inkübe edilmiş ve 18-24 saat analiz edilmiştir. İnhibisyon zonları ölçülmüş ve zon çapları en yakın milimetreye göre rapor edilmiştir.

3.4.7 Moleküler çalışma

3.4.7.1 DNA ekstraksiyonu

Gece boyunca inkübe edilen 1 ml'lik kültür, 3 dk 12.000 devir/dk hızında santrifüj yapılarak hücre pelleti elde edilmiştir. Bundan sonra süpernatant atılmıştır. 180 µl GT tamponu pelet üzerine dökülmüştür ve süspansiyonu oluşturmak için vorteksle birleştirilmiştir. Proteinlerin parçalanmasına yardımcı olmak için çözeltiye 20 µL proteinaz K eklenmiştir. Tüm karışımlar minimum 10 dk süreyle 60 °C'de inkübe edilmiştir.

Numuneye 200 µL GB tamponu eklenmiş ve hücre lizizine neden olmak için 10 sn vortekslenmiştir. Örneğin lisatının berrak olduğundan emin olmak için kombinasyon, en az 10 dk boyunca 70 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra, kabarcıkları ortadan kaldırmak için numuneler santrifüjde 10 sn döndürülmüştür.

Çizelge 3.7, Örnek lizatına 200 µL %100 etanol eklenmiş ve DNA bağlanması için hemen kuvvetlice karıştırılmıştır. Karışım daha sonra GD kolonuna aktarılmış ve çözünmeyen çökeltiyle birlikte 1 dk boyunca 16099 g 'de santrifüjlenmiştir. Akışkan, içinde bulunduğu GD toplama tüpünden uzaklaştırılmıştır ve taze bir GD toplama tüpü GD sütunuyla doldurulmuştur. GD sütununu yıkamak için, 400 µl W1 tamponu eklenerek, akışkan 30 sn boyunca 12.000 devir/dakika hızında santrifüj yapıldıktan sonra atılmıştır. Ardından 3 dk boyunca 12.000 devir/dakika hızında santrifüj yapılarak akışkan atılmıştır ve GD sütunu, 600 µL yıkama tamponu (etanol sağlandığından emin olunmalıdır) ile birlikte 2 ml toplama tüpüne tekrar yerleştirilmiştir. Boş kolon matrisini kurutmak için 16099 g'de 3 dk santrifüjlenmiştir.

Çizelge 3.7 Mevcut çalışmada kullanılan PCR reaksiyon karışım hacimleri protokolü

Ana karışım bileşenleri	**Stok**	**Hacim (µl)**
Toplam hacim	20	
Tek rxn başına alikot	18 µl of Master mix per tube and add 2 µl of template	
DNA	ng/µl	2
İleri primer	10µM	1
Ana Karışım	2X	10
Nükleaz İçermeyen Su	-	6
Ters primer	10µM	1

3.4.7.2 Termal döngü protokolü

Karışım içeren PCR tüpleri, DNA'nın çoğaltıldığı (Çizelge 3.8) bir termosiklöre taşınmıştır.

Çizelge 3.8 Termal döngü protokolü

Aşamalar	**ºC**	**Dakika: Saniye**	**Döngü**
İlk Denatürasyon	95	05:00	1
Denatürasyon	95	00:30	30
Bağlanma	52	00:30	
Uzatma	72	00:30	
Son uzatma	72	07:00	1
Tutunma	10	10:00	

3.4.7.3 Jel elektroforezi

PCR amplifikasyonunun ardından, amplifikasyonun varlığı agaroz jel elektroforezi kullanılarak doğrulanmıştır. Geri kazanılan DNA parametreleri polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan tek parametreler olarak bulunmuştur.

Agarozun hazırlanması:

- Bir şişe içinde yüz ml 1X TAE ayrılmıştır.

- %1,5 agaroz için 1,5 g kalkanı ilave edilmiştir.

- Çözelti, tüm jel atomları eriyene kadar kaynatılmıştır (Mikrodalga kullanılarak).

- Agaroza bir µl Etidyum Bromür (10mg/ml) ilave edilmiştir.

- Agaroz çeşitlendirilmek ve kabarcıklardan kaçınmak için köpürtülmüştür.

- Çözeltiler 55-60°C'de soğumaya bırakılmıştır.

Yatay agaroz jelin dökümü:

Agaroz çözeltisi eklenmiş, jel tepsisinin kenarları selofanla bantlanmış ve agaroz 30 dk boyunca oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Kapak dikkatlice çıkarılmıştır ve jel, jel tepsisine yerleştirilmiştir. Tepsi, jel yüzeyi 3-5 mm kaplanana kadar 1X TAE-elektroforez tamponu ile doldurulmuştur.

DNA yükleme:

Agaroz jel elektroforezinde tarak yardımıyla açılan kuyucuklara DNA örnekleri yüklenmeden önce, her 5 µl DNA'ya 2 µl yükleme boyası eklenmiştir. Boya eklendikten sonra PCR ürünleri hemen yüklenmiştir. PCR ürünü (10 µl), doğrudan kuyucuğa eklenmiştir. 75 dk boyunca 100 v/m Amp elektrik uygulanmıştır. DNA, katottan pozitif anot kutuplarına doğru hareket etmiştir. Jelin etidyum bromür ile boyanmış bantları, jel görüntüleme ekipmanı kullanılarak görülebilir hale getirilmiştir.

3.4.8 Bakteriyosin üretimi için bakteri izolatlarının taranması

Lactobacillus sakei olarak tanımlanan bakteri izolatları, Malheiros *et al.* (2015)'na göre bakteriyosin sentezleme kapasitelerini belirlemek için araştırılmıştır.

3.4.8.1 Bakteriyosin üretiminin başlatılması

Bakteriyosin üretimi, glikoz (5,0 ve 10 mg mL^{-1}), Tween 20 (10 ve 20 L mL^{-1}), Tween 80 (10 ve 20 L mL^{-1}), sodyum sitrat (0,3 ve 1,0 mg mL^{-1}), potasyum klorür (0,55 ve 3 mg mL^{-1}) ve sistein (0,25 ila 1,0 mg mL^{-1}) ile desteklenmiş MRS broth içinde değerlendirilmiştir.

Bu takviyeler, bakteriyosin üretimi üzerinde daha önce bildirilen etkilerine göre seçilmiştir. Takviyeler MRS besiyerine eklenmiş ve filtrasyon (0,22 m, Millipore) yoluyla sterilize edilen sistein hariç otoklavlama (121°C'de 15 dk) yoluyla sterilize edilmiştir. Kültür ortamının pH'sının bakteriyosin üretimi üzerindeki etkisi, MRS broth'un başlangıç pH'sı steril 1N HCl ile 4.5, 5.0, 5.5 ve 6.0'a ayarlanarak belirlenmiştir (Castro *et al.* 2011).

Test edilen tüm besiyerleri bir gecelik *L. sakei* 2a (%1 v/v) kültürü ile aşılanmış ve 18 saat boyunca 25°C'de inkübe edilmiştir. Sıcaklığın bakteriyosin üretimi üzerindeki etkisi, *L. sakei* subsp içeren MRS besiyerinin 18 saat boyunca 25, 30, 37 ve 40°C'de inkübe edilmesiyle değerlendirilmiştir. İnkübasyondan sonra, besiyerlerinin pH'ı 10N NaOH ile 6,5'e ayarlanmış ve 30 dk boyunca 80°C'de ısıtılmıştır. Hücreler 4°C'de 15 dk boyunca 10.000 x g'de santrifüj edilerek elde edilmiştir.

3.4.9 *S. mutans* bakterisi üzerinde antimikrobiyal aktivite tespiti

1- Saf *S. mutans* izolatları, bakteriyosinin antagonistik aktivitesini tespit etmeden önce MSA besiyeri kullanılarak alt kültüre alınmış ve 48 saat boyunca anaerobik olarak inkübe edilmiştir.

2- Bakteriyel inokulum, deneyde kullanılan bakterilerin kolonilerinin steril koşullar altında, 1,5 x 10 hücre ml'sine eşdeğer 0,5 McFarland Standardı bulanıklığı verecek şekilde 5 ml beyin kalp infüzyon suyu içeren bir test tüpüne aktarılmasıyla hazırlanmıştır (Carvalho *et al.* 2018). MSA besiyeri içeren kaplara 0,1 ml bakteri

süspansiyonu yayılarak inoküle edilmiş, ardından bakteri süspansiyonunun emilmesi için kaplar oda sıcaklığında 15 dk bekletilmiştir.

3- Bakteri ile aşılanmış MSA besiyerinde 7 mm çapında steril bir mantar delici kullanılarak kuyular açılmıştır.

4- Farklı konsantrasyonlarda 25, 50, 100, 200 µg/ml bakteriyosinden 50 µl mikropipet yardımıyla aktarılmış ve kuyucukların içine yerleştirililmiştir.

5. Kontrol kapları, kuyucuklara bakteriyosin yerine 50 µl steril distile su konularak hazırlanmıştır.

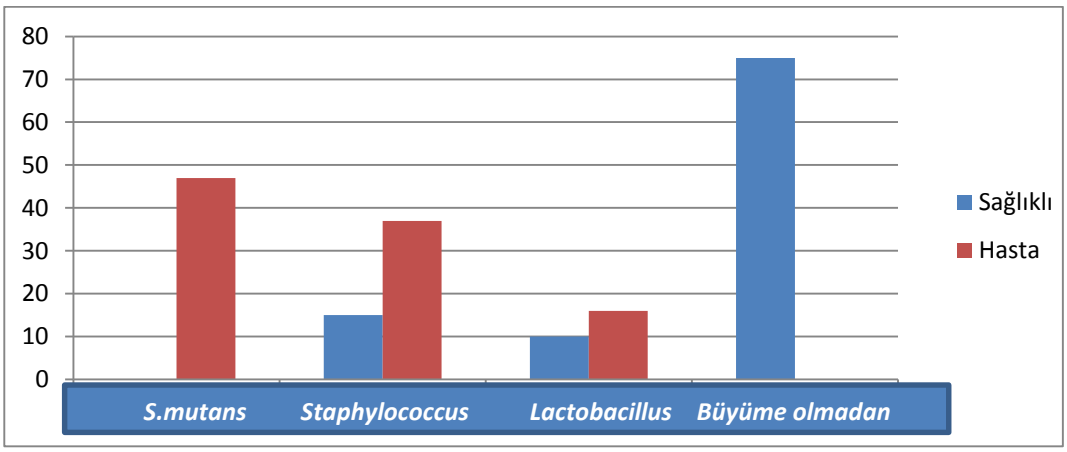
6- Daha sonra kaplar 37°C'de 48 saat boyunca inkübe edilmiş, ardından kuyucukları çevreleyen bakteri üremesinin olmadığı bölgeyi temsil eden inhibisyon bölgesinin çapı ölçülerek sonuç değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 *Streptococcus mutans*'ın İzolasyonu

S. mutans izolasyonu ve teşhisi amacıyla, Kasım başından Aralık 2022 sonuna kadar olan dönemde, farklı yaşlardaki sağlıklı (60) ve hasta (60) bireylerden uzman doktor gözetiminde 120 sürüntü örneği toplanmıştır. Örnekler, *Streptococcus* ve diğer bazı oral bakterilerin üremesini destekleyen Mitis Salivarius Agar (MSA) besiyerinde ve ayrıca *S. sobrinus* ve *S. mutans* hariç çoğu bakteri türünün üremesini engelleyen (%20 sükroz ve (2.0 g/ml) Bacitracin içeren Mitis Salivarius Bacitracin Agar (MSBA) besiyerinde kültüre edilmiştir.

Sağlıklı örneklerden 15 izolatın (%25) *Lactobacillus* spp. ve *Staphylococcus* spp.'ye ait olduğu, 45 izolatta (%75) ise herhangi bir üreme olmadığı görülmüştür. Hasta örneklerden 28 izolatın (%47) *S. mutans*'a, 22 izolatın (%37) *Staphylococcus* spp. ve 10 izolatın (%16) *Lactobacillus* spp. türlerine ait olduğu görülmüştür (Şekil 4.1).

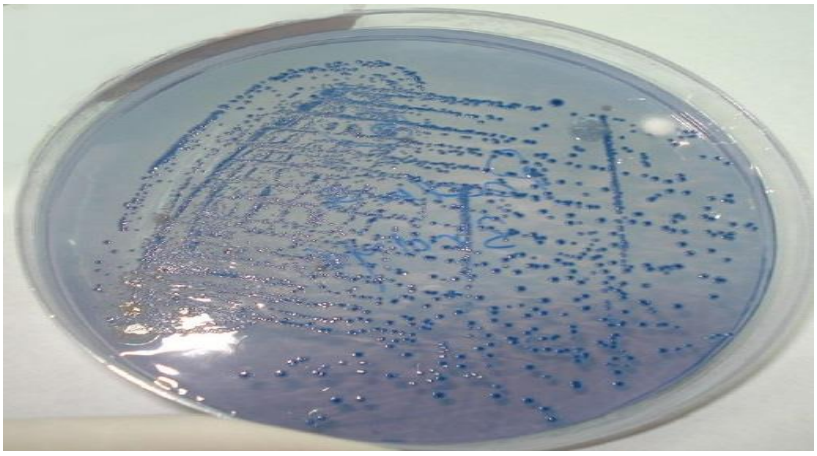


Şekil 4.1 Sağlıklı ve hasta bireylerden izole edilen izolatların yüzdesi

4.2 *Streptococcus mutans*'ın Bakteriyel Tanısı

4.2.1 *S. mutans*'ın kültür karakterleri

S. mutans izolatları 37°C'de 48 saat boyunca aerobik koşullar altında yetiştirildikten sonra katı besiyerinde (MSA) büyüme göstermiştir. Koloniler küçük, kabarık, düzensiz ve bazılarına yapışıkken, (MSBA) besiyerinde üreyen izolatlar boncuk veya damlaya benzer 1 mm çapa sahip, şekere fermente olmuş olarak karakterize edilmiştir (Şekil 4.2, Vacharaksa *et al.* 2015). Kanlı agarda *S. mutans* izolatları grimsi beyaz, pürüzsüz, parlak ve yarı saydam koloniler göstermiş ve α-hemoliz bölgeleri ortaya çıkmıştır.



Şekil 4.2 MSBA besiyerinde *S. mutans*

4.3 *S. mutans*'ın Hızlı Ayırt Edilmesi

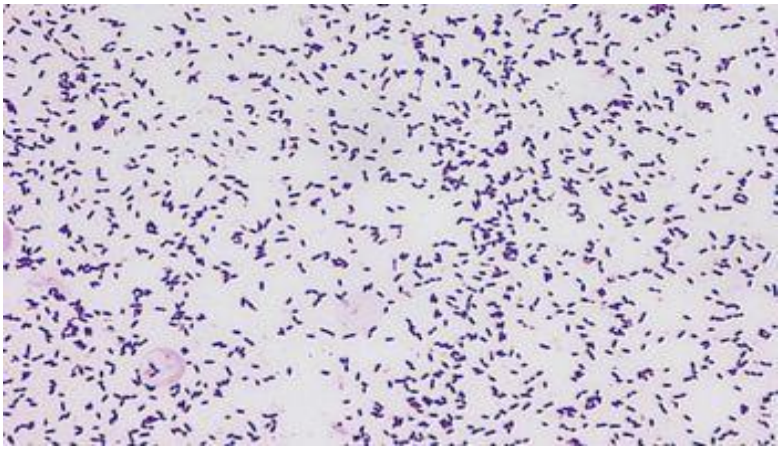
Bu test, *S. mutans*'a ait kolonileri diğer streptokoklar, örneğin *S.sanguis*, üzerinde MSA besiyerinde hızlı bir şekilde ayırt etmek için kullanılmıştır. MSA besiyerine, mannitol (%10) ve 2,3,5-trifenil tetrazolyum klorür (TTC) (%4) eklenerek *S.sanguis* kolonileri, mannitolün 1-1-fosfat dehidrogenaz ve TTC redüktaz tarafından aside ayrıştırılması sonucunda, izolatlar için bakteri kolonilerinin renginde bir değişiklik meydana gelmiştir. Şekil 4.3'te gösterildiği gibi, kolonilerin rengi mavidan pembe veya açık kırmızıya dönüşmüştür. Kolonilerin renginin mavidan koyu pembe veya kırmızıya dönüşmesi, *S. mutans*'ın varlığını göstermektedir (Rikhtegaran *et al.* 2016).



Şekil 4.3 MSA besiyerinde %10 Mannitol ve %4 TTC eklenmeden önce ve sonra *S. mutans* kolonileri

4.4 Mikroskobik İnceleme

S.mutans izolatlarının gram boyamasında gram pozitif, küresel veya oval şekilli, tespih şeklinde ve çiftler veya zincirler halinde dizilmiş olduğu görülmüştür (Şekil 4.4).



Şekil 4.4 *S. mutans* Gram boyama

4.5 Biyokimyasal Testler

S. mutans bakterisinin 28 izolatı üzerinde yapılan biyokimyasal testlerin sonuçları, tüm izolatların katalaz için negatif olduğunu ve şekerlerin fermentasyonu ve %4 tuz konsantrasyonuna sahip besiyerinde fermente büyüme yetenekleri açısından pozitif olduğunu göstermiştir.

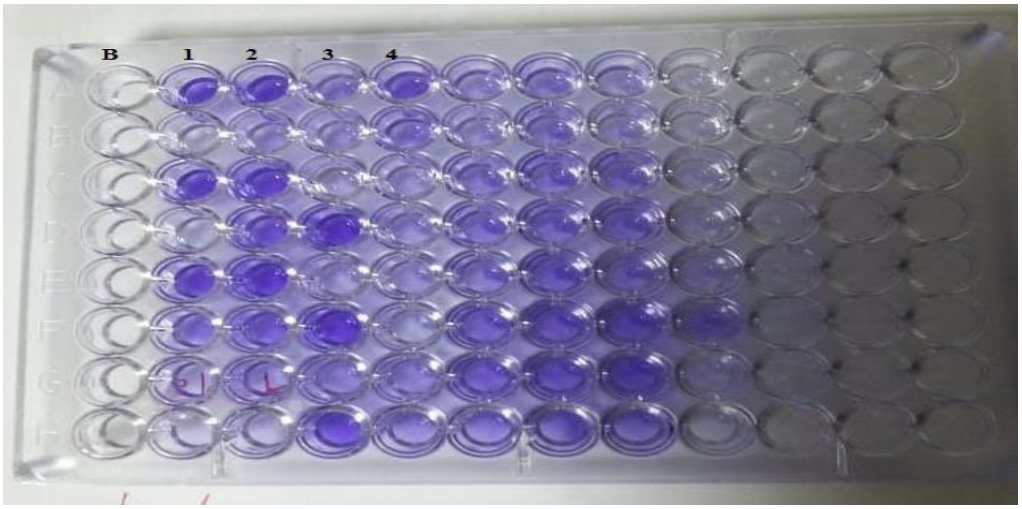
4.6 Biyofilm Oluşumu

Mikro Titer Plak (MTP) yöntemi kullanılmıştır (Şekil 4.5). *S. mutans* izolatlarının çoğunun biyofilm ürettiğini görülmektedir (Çizelge 4.1, Şekil 4.6). İzolatların 9/28'i (%32) güçlü biyofilm oluştururken, 15/28'i (%54) orta düzeyde biyofilm oluşturma yeteneğine sahiptir ve 4/28'i (%14) biyofilm oluşturmamıştır.

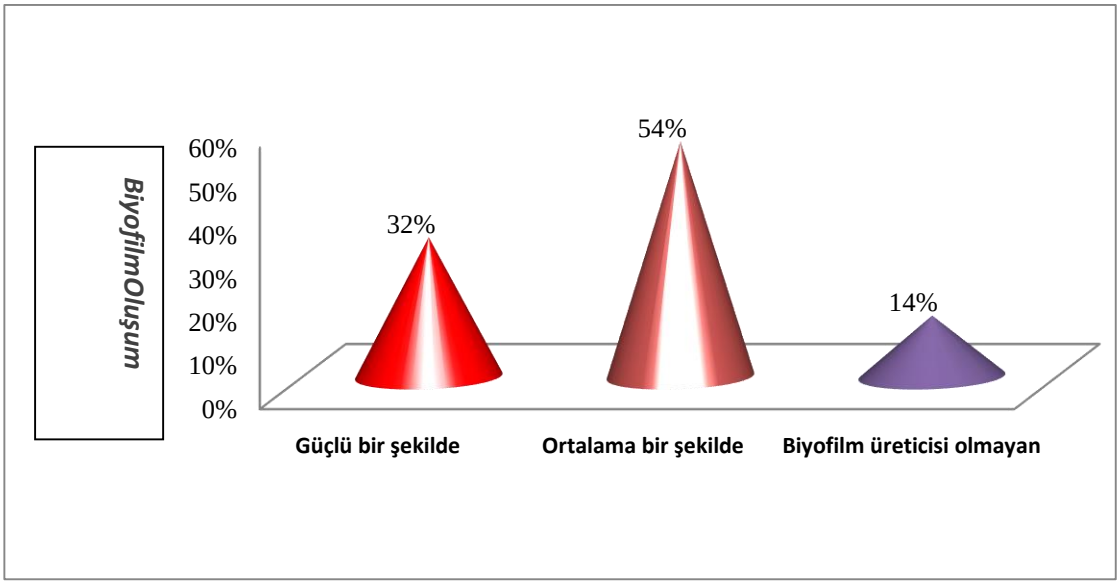
Çizelge 4.1 *S. mutans* izolatları için biyofilm oluşumu

Örnek No.	Emicilik (630 nm'de)	(ODc=0.051) (2*ODc=0.112) ile karşılaştırıldığında biyofilm oluşumu	Örnek No.	Emicilik (630 nm'de)	(ODc=0,051) ile karşılaştırıldığında biyofilm oluşumu (2*ODc=0,112)
S1	0.073	Orta düzeyde	**S15**	0.081	Orta düzeyde
S2	0.120	Güçlü	**S16**	0.118	Güçlü
S3	0.068	Orta düzeyde	**S17**	0.064	Orta düzeyde
S4	0.074	Orta düzeyde	**S18**	0.077	Orta düzeyde
S5	0.069	Orta düzeyde	**S19**	0.061	Orta düzeyde
S6	0.118	Güçlü	**S20**	0.121	Güçlü
S7	0.031	Biyofilm yok	**S21**	0.068	Orta düzeyde
S8	0.120	Güçlü	**S22**	0.079	Orta düzeyde
S9	0.071	Orta düzeyde	**S23**	0.044	Biyofilm yok
S10	0.116	Güçlü	**S24**	0.072	Orta düzeyde
S11	0.075	Orta düzeyde	**S25**	0.116	Güçlü
S12	0.115	Güçlü	**S26**	0.075	Orta düzeyde
S13	0.038	Biyofilm yok	**S27**	0.039	Biyofilm yok
S14	0.072	Orta düzeyde	**S28**	0.110	Güçlü

OD (Test edilen izolatları temsil eder); ODc (Kontrol çukurlarını temsil eder)



Şekil 4.5 Mikro Titre Plaka yöntemiyle *S. mutans*'ın biyofilm oluşumu



Şekil 4.6 *S. mutans* izolatlarının biyofilm oluşturma yüzdesi

S. mutans, iki aşamada gelişen biyofilm üretme kapasitesine sahiptir. Aradaki fark, ilk aşamada mine üzerindeki konakçı veya kolonize bakteriyel ürünlerin bakterinin yüzey proteinleriyle etkileşime girmesidir. İkinci aşamada, bakteriler birbirleriyle veya farklı türlerle kümelenerek ve hücre dışı glukan üreterek biyofilmler halinde toplanırlar (Lamonet and Jenkinson 2019).

Bakterilerin biyofilm olarak bilinen çok boyutlu karmaşık yapıyı oluşturma kapasitesi, çeşitli hastalıkların gelişiminde çok önemlidir (Krzysciak *et al.* 2014). Bazı oral streptokok bakterileri biyofilm oluşturma yeteneğine sahiptir, *S. mutans* biyofilm üreten en önemli ve en yaygın türlerden biridir. Bu bakteriler, hayatta kalmak ve çevresel koşullara direnç göstermek için hayati önem taşıyan bir biyofilm oluşumu modeli geliştirmiştir (Lemos *et al.* 2019). Dental çürükleri, diş ve diş eti yüzeyinde bakteriler tarafından oluşturulan biyofilm tabakalarının önemli bir neden olduğu ağız boşluğundaki en yaygın bulaşıcı hastalıktır. *S. mutans*, söz konusu hastalık için ana etiyolojik nedenlerden biridir (Klein *et al.* 2018).

Bazı araştırıcılar, *S. mutans* izolatlarının çoğunun biyofilm oluşturduğu sonucuna varmıştır (AL-Kazirragy 2017, Zezhang *et al.* 2019). *Streptococcus* patojenitesinin belirleyicileri, bakteriyel yüzeylerde bulunan pilus ile karşılaştırılabilir uzun filamentli

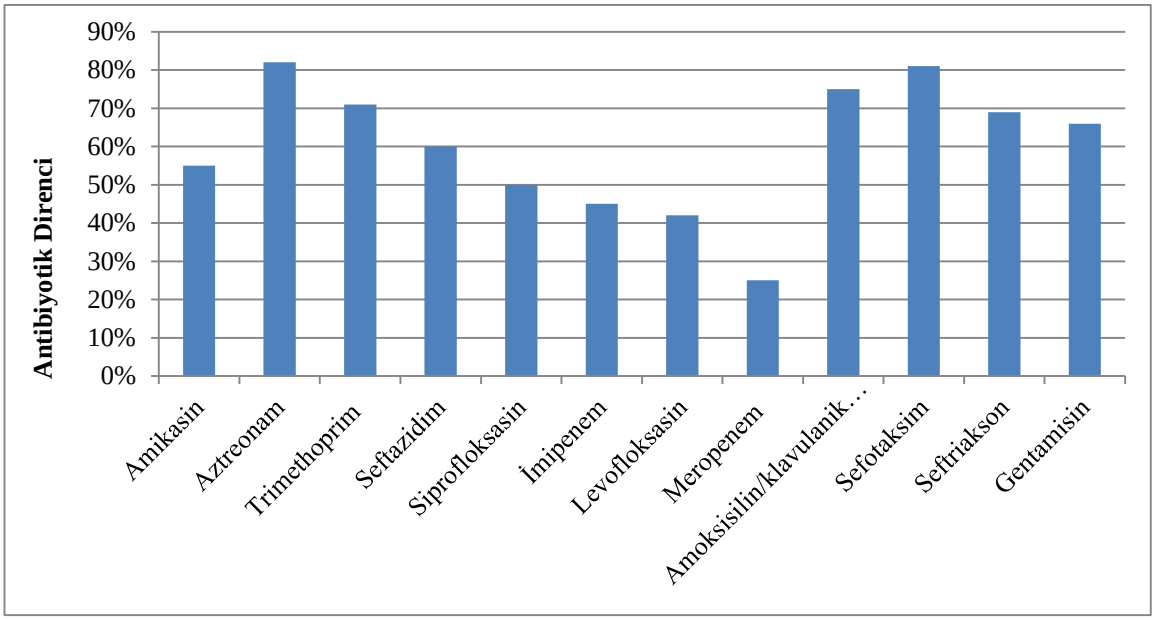
yapıların keşfine bağlıdır, Kreikemeyer *et al.* (2011)'nın biyofilm yapısı üzerine yaptığı çalışmaya göre, bu yapılar yapışkan niteliklere sahiptir ve *Streptococcus* türlerinin patojenlerinin konakçı hücrelere ve dokulara yapışarak biyofilm oluşturması için gerekli olabilir.

4.7 *S. mutans*'ın Antibiyotik Duyarlılık Testi

Lokal olarak izole edilen *S. mutans*'ın antibiyotik duyarlılık profili araştırılmıştır. *S. mutans*'ın klinik izolatlarının incelenen antibiyotiğe karşı dirençleri şekil 4.7'de verilmiştir: Amikasin %55 (n=15), Aztreonam %82 (n=23), Trimetoprim/Sulfametoksazol %71 (n=20), Seftazidim %60 (n=17), Siprofloksasin, %50 (n=14), Gentamisin %66 (n=19), İmipenem %45 (n=13), Levofloksasin %42 (n=12), Meropenem %25 (n=7), Amoksisilin/Klavulanik Asit %75 (n=21), Sefotaksim %81 (n=23) ve Seftriakson %69 (n=19).

Çizelge 4.2 Antimikrobiyal disk

Antibiyotik diskleri	Dirençli	Orta	Duyarlı
Amikasin	(55%) 15	(10%) 3	(35%) 10
Aztreonam	(82%) 23	(0%) 0	(17.85%) 5
Sülfametoksazol ve trimetoprim	(71%) 20	(0%) 0	(28.57%) 8
Seftazidim	(60%) 17	(0%) 0	(39.28%) 11
Siprofloksasin	(50%) 14	(0%) 0	(50%) 14
Gentamisin	(66%) 19	(4%) 1	(29%) 8
İmipenem	(45%) 13	(0%) 0	(54%)15
Levofloksasin	(42%) 12	(0%) 0	(57.14%) 16
Meropenem	(25%) 7	(0%) 0	(75%) 21
Amoksisilin/klavulanik asit	(75%) 21	(0%) 0	(25%) 7
Sefotaksim	(81%) 23	(0%) 0	(18%) 5
Ceftriaxone	(69%) 19	(3%) 1	(28%) 8



Şekil 4.7 *S. mutans*'ın antibiyotiklere karşı direnç yüzdesi

Mevcut çalışmada, antibiyotik direnç testi Aztreonam ve Sefotaksime karşı sırasıyla %82 ve %81 oranında yüksek bir direnç yüzdesi görüldüğünü ortaya koymuştur; bu sonuçlar Aztreonam ve Sefotaksim direncini sırasıyla %85 ve %80 olarak belirten (Raji *et al.* 2013)'in çalışması ile uyumludur.

Siprofloksasin ve Gentamisin için mevcut sonuçların direnç yüzdesi sırasıyla %50 ve %66'dır. AL-Kazirragy (2017)'nin çalışmasında İmipenem ve Levofloksasin direncinin sırasıyla %45 ve %42 olduğu belirtilmiş olup sonuçlar mevcut bu çalışmayla uyumludur.

Liao *et al.* (2017) tarafından yayınlanan bir başka çalışmada, *S. mutans* kromozomal DNA'sının, 23s rRNA'yı metilleyerek ribozomun bağlanma bölgesini değiştiren ve ilacın bağlanma yeteneğini engelleyen heterolog bir eritromisin direnç geni içerdiği bulunmuştur. Eritromisin duyarlı organizmalarda protein sentezini inhibe etmektedir.

Tsuda *et al.* (2002)'na göre, *S. mutans*'ın basitrasin direncine, varsayılan bir ABC taşıyıcısını (MbrAB) ve iki bileşenli bir düzenleyici sistemi (MbrCD) kodlayan bir gen lokusu (mbrABCD) aracılık etmektedir. Bu lokustaki her *Mbr* geninde bozukluğu olan

tüm *S. mutans* suşları, vahşi tip suşa göre yaklaşık olarak 100-120 kat daha duyarlıdır ve baktirisine karşı etkilidir.

Dünyanın çoğu bölgesinde, -laktam gibi antibiyotiklere karşı bakteriyel direnç halk sağlığı için bir sorundur. Birçok in-vitro deney, akraba türlerin penisilin direnci belirleyicilerini paylaşabileceğini göstermiştir (Al-Shami *et al.* 2019). Bu süreçler, seçici antibiyotik baskısı ile birlikte oral streptokoklarda penisilin direncinin oluşmasına ve yayılmasına önemli ölçüde katkıda bulunabilir (Delfani *et al.* 2017).

Laktam ve laktam olmayan antibiyotiklerin en düşük inhibitör konsantrasyonunun daha fazla çalışılması gerekmektedir. Ayrıca bu bulgular, profilaksi sırasında antibiyotik duyarlılık testlerinin değerlendirilmesinin geliştirilmesini gerektirmektedir (Wang *et al.* 2021). Antibiyotiklere karşı yaklaşan bakteriyel dirençten kaçınmak için, bitkisel özüt gibi alternatif bir antibiyotik muhtemelen önümüzdeki yıllarda tercih edilecektir. Ayrıca, *S. mutans*'ın klinik izolatlarında antibiyotik direncindeki artış, reçete yazarken daha dikkatli olunmasını tavsiye etmektedir (Al-mohammadawy *et al.* 2018).

4.8 PCR kullanılarak *16S rRNA* ve Gtf*D*'nin Moleküler Tanımlanması

Araştırma kapsamında yapılan gözlemler, izolatlarda *16S rRNA* geninin varlığını ortaya koymuştur ve tüm izolatların (%100) bu geni taşıdığı tespit edilmiştir. PCR sonuçları, replikasyon ipliklerinin DNA merdiven boyut kılavuzuyla karşılaştırıldığında 150 baz çifti boyutunda olduğunu göstermiştir. Kore/Bioneer'dan gelen moleküler boyutlandırma ve doğrulama sonuçları, elde edilen çizgilerin Ihara *et al.* (2019) tarafından elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldığında beklenen boyutlara sahip olduğunu göstermektedir.

DNA ekstraksiyon ürünleri, ekstrakte edilen nükleik asidin konsantrasyonunu ve saflığını belirlemek için bir Nanodrop cihazı kullanılarak tespit edilmiştir; saflık 1.5-1.8 arasında değişmektedir. PCR yöntemleri bakterilerin tanımlanmasını doğrulamak için 22 izolatın *16S rRNA*'sı çoğaltılmıştır. *S. mutans* izolatlarının DNA'sı, *16S rRNA*'nın

korunmuş bölgesi için primerler kullanılarak PCR ile çoğaltılmış ve PCR ürünleri bir agaroz jel üzerinde ayrılmıştır. Flayyih *et al.* (2016) tarafından yayınlanan bir başka çalışma, *S. mutans*'ın 22'sinin (%100) 120 bp'lik bir *16S rRNA* gen bandına sahip olduğunu ve bu yöntemin *S. mutans* izolatlarını tanımlamak için bakteriyolojik ve biyokimyasal testlerden daha güvenilir olduğunu göstermiştir. Rampini *et al.* (2017) göre, *16S rRNA* gen PCR hassas, spesifik ve kültüre yanıt vermeyen bakteriyel enfeksiyonların teşhisinde etkilidir. Ayrıca, daha önce antibiyotik tedavisi görmüş hastalarda bakteriyel patojenlerin tanımlanmasında da yardımcı olmuştur.

Al-Ahmad *et al.* (2016) tarafından yapılan *16S rRNA* geni PCR çalışmasında, *S. mutans* için özgül olması beklenen primerlerin aslında *S. mutans*'a spesifik olmadığı ve aynı zamanda diğer 12 streptokok suşunu da tespit ettiği bulunmuştur. Ancak kariyojenik *S. mutans*'ı belirlemek için *16S rRNA* geni PCR'de kullanılan *S. mutans* spesifik primerlerinin *S. mutans* için özgül olduğu belirlenmiştir. Araştırmada incelenen izolatlarda gtf*D* geni analiz edilmiştir ve tespit sonuçlarına göre, bu geni taşıyan 12 izolatın %90 oranında ve yüksek derecede anlamlı bir farkla (P = 0.01) bulunduğu görülmüştür (Saleh *et al.* 2019) . PCR sonuçlarına göre, genin boyutu 135 baz çifti olarak belirlenmiştir.

Mevcut çalışmanın bulguları, *S. mutans*'ın glukan sentezleyen ve diş plağında önemli bir rol oynayan glukoziltransferazı kodlayan bir gtf genine sahip olduğunu keşfeden Ham *et al.* (2022)'nin bulgularıyla da tutarlıdır.

Ayrıca, PCR yöntemleri gtf*D* geninin tespiti için yararlıdır, böylece oral *S. mutans* tıbbi uygulamalarda başarılı bir şekilde kullanılabilir.Mevcut araştırmadan elde edilen bulgular Bedoya-Correa *et al.* (2019) tarafından elde edilenlerle tutarlıdır ve diş çürüğü hastalarından izole edilen *S. mutans*'ta gtf*D* geninin doğru fenotiplenmesi ve genotiplenmesini tanımlamaktadır.

Flayyih *et al.* (2016) tarafından yapılan başka bir çalışma, izolasyon kaynağına bağlı olarak tüm 22 *S. mutans* izolatının (%100) biyofilm oluşturma kapasitesine sahip farklı kapasitelerde 3 adet gtf genine sahip olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca, Hao *et al.*

(2018) çeşitli gen ifadesi desenlerinin, özellikle biyofilm kontrolü, gelişimi ve bakteriyel fizyoloji ile ilişkili olanların implant, restoratif malzeme veya mine gibi çeşitli diş yüzeylerinde bakteri birikimine bağlanabileceğini belirtmiştir.

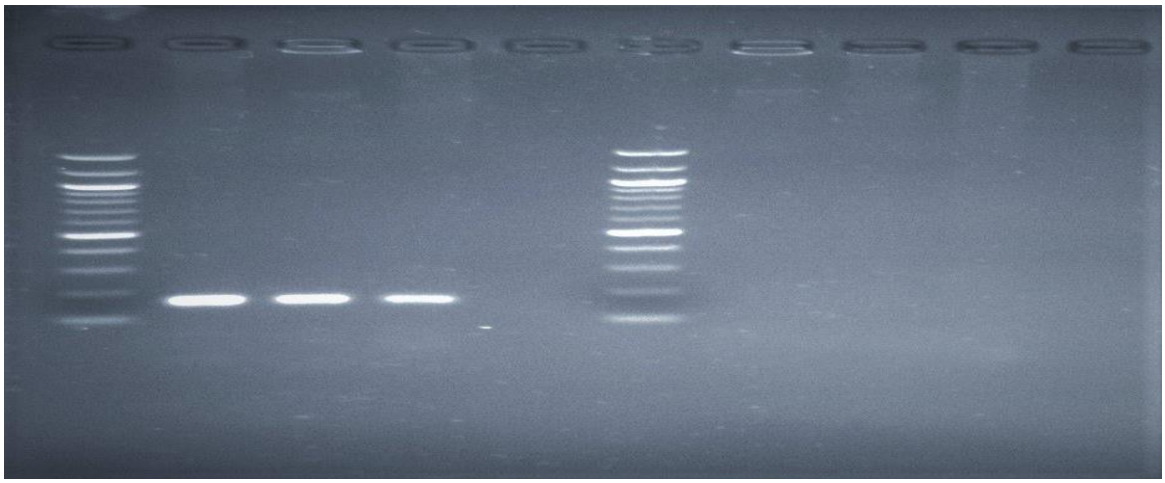
Gtf, diş minesindeki bakteriyel bağlanma bölgesini besler ve bazı bakteriyel ağız boşluğu ile birikim için sükrozdan glukan polimerlerinin oluşumunda kullanılır. Gtf'ler önemli miktarlarda sükroz sentezlemek için kullanılabilir, diş çürüğüne neden olan ve şüpheye yer bırakmayacak şekilde kanıtlanmış olan kilit virülans faktörleri, şekerin fermantasyonu yoluyla organik asit (laktik asit) miktarlarını artıran muazzam glukan seviyeleridir (Bedoya-Correa *et al.* 2019, Ham *et al.* 2022).

Yukarıda belirtildiği gibi, *S. mutans* müdahalesinin neden olduğu diş hasarından neredeyse tamamen bakteriyel metabolizma sorumludur. Ağızdaki diğer streptokokların aksine, *S. mutans*'ın virülans özellikleri ilk kez fark edilmiştir. Bu tür in vitro testler, ilk olarak Kareb ve Aïder (2019) tarafından, sukrozun ekstraselüler polisakkaridlere dönüştürülme yeteneği nedeniyle, düz yüzeylerin kolonizasyonunu bir virülans değişkeni olarak keşfedilmiştir.

S. mutans, gtf*B*, gtf*C* ve gtf*D* genleri tarafından ifade edilen gtf'lerin etkisiyle, sükrozu kullanarak 1,3 ve 1,6 bağlı glukan polimerleri üretir. Çözünür ve çözünmez glukanların bir karışımını üreten gtf*b*, gtf*d* ve gtf*c*'nin aksine, gtf*b* öncelikle mutan adı verilen ve -1,6-bağlı glukoz bakımından zengin olan suda çözünmez glukanlar üretir (Ren *et al.* 2016a).

S. mutans'ta bulunan 1.500 uzun amino asitli gtf'nin iki fonksiyonel alanı bulunmaktadır. Mutlak amino fraksiyonu, sukroz molekülünün periferinden bir katalizör tarafından bölünürken, karboksil dextranın bağlanmasını indüklemektedir (Al-Dabagh *et al.* 2020).

Çeşitli çalışmalar, *S. mutans*'ın gtf mutant suşları kullanıldığında bakterilerin karyojenitesinde ve pürüzsüz yüzeylere yapışma veya in vitro biyofilm oluşturma kapasitelerinde bir azalma olduğunu göstermiştir (Zhang *et al.* 2021).



Şekil 4.8 %2 agaroz jelinde elektroforez edilen gtf*D* (*S. mutans*) bölgesinin 135 bp'lik PCR ürünü

4.9 Bakteriyosin Üretiminde *L. sakei* İzolatlarının Taranması

L. sakei'nin yerel olarak izole edilen suşları, etkili bakteriosin üretimi için seçim yapmak amacıyla taranmıştır. Bu izolatların bakteriosin üretme yetenekleri, 37°C'de beyin kalp infüzyon besiyeri ortamında kültürlenip optik yoğunluğun 0.8'e ulaşmasıyla inkübasyon yapıldıktan sonra kültür filtratındaki ham bakteriosin kullanılarak antagonistik etki 10 izolat (*S. mutans*) üzerinde ölçülerek inhibisyon bölgeleri well difüzyon yöntemine göre incelenmiştir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3 *L. sakei*'nin *S. mutans*'a karşı inhibisyon zonları ile ifade edilen bakteriyosin üretim yeteneği

Örnek No	25 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml	200 µg/ml
S1	R	9mm	16mm	20mm
S2	R	9mm	15mm	22mm
S3	R	8mm	15mm	23mm
S4	R	10mm	16mm	21mm
S5	R	9mm	13mm	19mm
S6	R	12mm	16mm	22mm
S7	R	8mm	14mm	21mm
S8	R	11mm	15mm	23mm
S9	R	10mm	16mm	21mm
S10	R	9mm	14mm	21mm

S: *S. mutans* R: Direnç mm: milimetre

Çizelge 4.2'deki sonuçlar, *L. sakei* tarafından üretilen bakteriyosinin 9 ila 23 mm arasında değişen inhibisyon zonlarına göre 10 *S. mutans* izolatının tümü üzerinde etkili olduğunu göstermiştir.

Mevcut sonuçlar, 25 µg/ml konsantrasyonun tüm *S. mutans* bakteri izolatlarına karşı herhangi bir etki göstermediğini ortaya koyarken, 50 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarda bakteriyosinin *S. mutans* izolatları üzerindeki inhibisyon çapı sırasıyla 9-12 mm ve 14-16 mm arasında değişmektedir. 200 µg/ml konsantrasyonu, *S. mutans* izolatlarına karşı (19-23) mm aralığında yüksek etki gösterdi.

10 *L. sakei* izolatı arasında, bakteriyosin üretiminde en iyi olan *L. sakei, S. mutans*'a karşı maksimum çapta inhibisyon zonu 23 mm vermiştir (Çizelge 4.2). Bu sonuçlara göre, mutasin üretimi için optimum koşulları incelemek üzere bu izolat seçilmiştir. Guo *et al.* (2017)'da bakteriyosinin Gram-pozitif bakterilere karşı ancak dış membranı değiştiren ve böylece sitoplazmik membrana erişim sağlayan işlemlerden sonra aktif olduğunu göstermiştir.

Rossoni *et al.* (2018) tarafından yapılan bir çalışmada, *L.fermentum* süpernatantının 260 mL *S. mutans* süspansiyonu, 260 mL *Lactobacillus* süpernatantı ve BHI broth ile inkübe

edildikten sonra *S. mutans* CFU/mL sayısını önemli ölçüde azalttığı bulunmuştur. *L.fermentum*, geniş bir gram-pozitif bakterilere karşı antimikrobiyal etkiye sahip olduğu gösterilmiş olan bir bakteriosin üretmektedir, bu nedenle *S. mutans*'a karşı en olası antimikrobiyal ajan olarak kabul edilmektedir (Mokoena 2017). Ayrıca *L.fermentum* durgun fazda biyosurfaktanlar üretmektedir bunun da *S. mutans*'ın yapışma yeteneği ve biyofilm oluşturma sürecine etki ettiğini göstermektedir (Prado *et al.* 2015).

Bakteriyosinler olarak bilinen antimikrobiyal maddeler çok sayıda bakteri türü tarafından üretilmektedir. Bunlar, patojenik ve bozucu bakterilerin büyümesini engelleyebilen ribozomal kodlamaya sahip proteinli bileşiklerdir ve laktik asit bakterileri (LAB) tarafından üretilenler gıda biyo-koruyucuları olarak çok fazla potansiyele sahiptir (Meade *et al.* 2020).

En kapsamlı şekilde araştırılan bakteriyosin, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* tarafından üretilen nisindir ve 50'den fazla ülkede gıdalarda kullanımı yasaldır (Jozala *et al.* 2015). Bununla birlikte, bazı bakteriler nisine direnç geliştirebilir veya etkilerine karşı koyan proteolitik bileşikler oluşturabilir (Parapouli *et al.* 2013, Alegra *et al.* 2014). Bu durumda gıda ve ilaç uygulamalarında kullanılan geleneksel antimikrobiyallerin dezavantajlarının ötesine geçmek için yeni LAB bakteriyosinlerinin araştırılması önemlidir (Yaacob *et al.* 2022).

LAB'nin bakteriyosin üretmesi için bakteriyel büyüme gereklidir ve en yüksek aktivite tipik olarak en yüksek hücre büyümesine karşılık gelir (Malheiros *et al.* 2015). Bununla birlikte sıcaklık, pH ve ortamın yapısı gibi çevresel değişkenlerin üretilen bakteriyosin miktarı üzerinde etkisi olabilir (Yang *et al.* 2018). LAB büyümesi için en çok kullanılan kültür ortamı hala MRS broth'tur (Juturu and Wu 2018).

Endüstriyel uygulamalar için optimum bakteriyosin üretimini sağlamak için bu unsurların incelenmesi gerekir. Bu bileşenlere örnek olarak MRS besiyerine eklenen karbonhidratlar, tuzlar, yüzey aktif maddeler veya oksijen gerilimini azaltıcı maddeler verilebilir (Peng *et al.* 2022).

Neredeyse tüm canlılar antimikrobiyal peptitler (AMP) üretir. Bunlar genetik materyale bağlanma, hücre duvarıyla etkileşim, hücre zarıyla etkileşim ve hücre içi organellerle etkileşim gibi çeşitli yollarla etkinliklerini gösterirler (Mahlapuu *et al.* 2016). AMP'lerin, potansiyelleri ve ökaryotik hücrelere yönelik etkileri göz önüne alındığında, bitkileri istilacı mantar ve bakteri türlerine karşı korumak için önemli olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte AMP'lerin konak hücreler üzerinde zararlı etkileri de olabilmektedir (Jenssen *et al.*2016).

Sınıf III bakteriyosinler istisnadır; bakteriyosinlerin çoğu katyoniktir ve 10 kDa'dan küçüktür ve bu onlara mikrobiyal hücrelere yapışabilmeleri ve prokaryotik seçicilikle fosfolipid membranlara nüfuz edebilmeleri açısından AMP'lere göre belirgin bir avantaj sağlar (Dicks *et al.* 2018).

Tepki yüzeyi metodolojisi (RSM), çeşitli uyarıcıların bakteriyosin üretimi üzerindeki etkilerinin araştırılması için iyi bir şekilde uyarlanmıştır ve özellikle biyoteknoloji olmak üzere birçok endüstride başarılı bir uygulama geçmişine sahiptir (Yolmeh and Jafari 2017). RSM, ortam ve çevre unsurlarının *L.lactis* tarafından üretilen bakteriyosinlerin antibakteriyel aktivitesini nasıl etkilediğini değerlendirmek için çalışmalarda kullanılmıştır (Onwuakor *et al.* 2020).

Diş çürüklerine karşı önleyici tedbirler, diş demineralizasyonu riskini azaltmaya ve bu süreci dişler geri döndürülemez şekilde hasar görmeden önce durdurmaya odaklanır (Pitts *et al.* 2017). Sonuç olarak, diş çürümesini önlemek için yenilikçi yaklaşımlar aramak değerli sonuçlar doğurabilir. Bakteriyoterapi olarak bilinen ve tehlikeli mikroplarla savaşmak için iyi huylu bakterilerin kullanılmasını içeren bu eski stratejinin kullanımı son yıllarda önemli ölçüde artmıştır (Twetman, S. 2012).

Terapötik amaçlarla sıklıkla kullanılan bu faydalı mikroorganizmalardan biri probiyotiktir. Uygun miktarlarda verildiğinde konakçıya sağlık açısından yarar sağlayan canlı mikroorganizmalar olarak tanımlanırlar (Behnsen *et al.* 2013).

Probiyotikler öncelikle normal mikrobiyotayı korumak veya eski haline getirmek ve patojenik mikropların büyümesini önlemek için kullanılır (Cagetti *et al.* 2013). Probiyotikler, öncelikle normal mikrobiyotayı korumak veya tekrar eski sağlıklı duruma döndürmek amacıyla ayrıca patojenik mikroorganizmaların büyümesini önlemek için de kullanılmaktadır (Cagetti *et al.* 2013). Bu etkilerini çeşitli yollarla gösterirler; antibakteriyel peptidleri salgılayarak tehlikeli bakterilerin büyümesini engelleyerek, asit üretimiyle pH seviyelerini düşürerek mukoza üzerinde besin ve yapışma alanları için rekabet ederek ve konak bağışıklık sistemini aktive ederek (Twetman, S. 2012).

Probiyotik ürünlerde tanımlanan bakterilerin çoğunluğu laktik asit bakterileridir ve bağırsak rahatsızlıklarının tedavisinde kullanılan başlıca bakteriler *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* türleridir (Ayivi *et al.* 2020). Probiyotik suşlar, diş hekimliğinde karyojenik bakterilere karşı antagonist olarak işlev görebilir, tükürük veya plakta *S. mutans* miktarını azaltabilir, ancak bu çalışmaların sonuçları hala tartışmalıdır (Samedi and Charles 2019).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

5.1 Sonuçlar

- *Streptococcus mutans* diş çürüklerinin nedenlerinden biridir.

- *S. mutans* izolatları çoklu antibiyotik direncine sahiptir ve bu da önemli bir terapötik zorluk teşkil etmektedir.

- *S. mutans* bakterilerinin büyük çoğunluğu biyofilm oluşturma yeteneğine sahiptir.

- *S. mutans* izolatlarında, PCR teknolojisi kullanılarak gtf*D* genlerinin varlığı tespit edilmiştir.

- *L. sakei*, bakteriyosin üreten bir suştur. MRS besiyerine glukoz ve Tween 20 eklendiği zaman daha fazla bakteriosin ürettiği görülmüştür.

- Örneklerin alındığı sağlıklı (n=60) ve hasta (n=60) bireylerin yaşları 7 ile 65 arasında değişen erkek, kadın ve çocuklardan oluşmaktadır. 7-14 yaş arası çocuklardan alınan örnek sayısı 20, 15-30 yaş arası kadın ve erkekleren alınan örnek sayısı 30'ar bireydir. 31-65 yaş arası kadın ve erkekleren alınan örnek sayısı 25'er bireydir. Sonuç olarak, *S. mutans* örnek sayısı 28 örnek olup, bunların çoğu her iki cinsiyetten 31 ila 65 yaş arasındadır.
- *S. mutans* hasta sayısı sadece 28'dir. Diğer bakteri türlerine sahip hasta sayısı ise 47'dir. Herhangi bir bakteri türünden sağlıklı insan sayısı sadece 45 kişidir.

5.2 Öneriler

- Konu kapsamında daha fazla çalışma yapılması (diş çürükleri konusunda diğer patojenleri izole etmek için) ve bu hastalığı önlemek ve kontrol etmek için bunlarla

ilişkili faktörlerin araştırılması, diş kaybı ve ağız ve diş eti sağlığı ile ilgili diğer özel komplikasyonlar nedeniyle oldukça önemlidir.

- Bakteriyel direncin gelişmesini ve tedavinin başarısız olmasını önlemek için antibiyotiklerin ayrım gözetmeksizin kullanılması konusunda kapsamlı çalışmalar yapılmalıdır.

- Ağızda sağlıklı *Streptococcus mutans* çürük bakterisinin sağlıklı taşıyıcılarının yüzdesini ve bunun bazı kalp ve solunum yolu hastalıklarıyla ilişkisini belirlemek için yoğun prospektif çalışmalar yapılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

Abdulhussein, R. A. 2018. Effect of dental knowledge and behavior on dental caries among children. MSc. Thesis, Baghdad University 66 page, Baghdad.

Abranches, J., Zeng, L., Kajfasz, J. K., Palmer, S. R., Chakraborty, B., Wen, Z. T. And Lemos, J. A. 2018. Biology of oral streptococci. Microbiology spectrum, 6(5): 6-5.

Acedo, J. Z., Chiorean, S., Vederas, J. C. and van Belkum, M. J. 2018. The expanding structural variety among bacteriocins from gram-positive bacteria. Fems microbiology reviews, 42(6): 805-828.

Aguayo, S., Donos, N., Spratt, D. and Bozec, L. 2016. Probing the nanoadhesion of *S. sanguinis* to titanium implant surfaces by atomic force microscopy. International journal of nanomedicine, 11: 1443.

Al-Ahmad, A., Auschill, T. M., Braun, G., Hellwig, E., and Arweiler, N. B.2016. Overestimation of *S. mutans* prevalence by nested pcr detection of the *16S rRNA* gene. J. of med microbiology, 55: 109–113.

Al–Dabagh, N. N., Ibrahim, Y. A. and Saeed, L. A. 2020. The role of *S. mutans* and Pathogenesis in the oral cavity. Journal of university of babylon for Pure and applied sciences, 28(2): 151-159.

Alegría, Á., Delgado, S., Roces, C., López, B. and Mayo, B. 2014. Bacteriocins produced by wild *L. lactis* strains isolated from traditional, starter-free cheeses made of raw milk. International journal of food microbiology, 143(1-2): 61-66.

Alejandra, B. M. and Daniel, O. M. 2020. Virulence factors of *S. mutans* related to dental caries. *Staphylococcus* and *Streptococcus*, 1: 9.

Alghamdi, S. 2022. Isolation and identification of the oral bacteria and their characterization for bacteriocin production in the oral cavity. Saudi Journal of Biological Sciences, 29(1): 318-323.

AL-Kazirrag. S. F.2017. The effects of glucan binging protein on *S. mutans* bioflim formation and determination of chemical inhibition . M.Sc thesis. College of science university of baghdad.

Almeida, R. B. A., Akisue, G., Cardoso, L. M. L., Junqueira, J. C. and Jorge, A. O. 2013. Antimicrobial activity of the essential oil of cymbopogon citratus (DC)

Stapf. On *Staphylococcus* spp., *Streptococcus mutans* and *Candida spp*. Revista brasileira de Plantas Medicinais, 15: 474-482.

Al-mohammadawy, Z. H., Aljarah, A. K. and Saad, A. M. 2018. Isolation and identification of *S.mutans* from dental caries by using sm479 gene. Indian Journal of public health research and development, 9: 100.

Al- Nasser, L. and Lamster, I. B. 2020. Prevention and management of periodontal diseases and dental caries in the older adults. Periodontology 2000, 84(1): 69-83.

Al-Shahrani, M. A. 2019. Microbiology of dental caries: A literature review. Annals of Medical and Health Sciences Research, 3: 8.

Al-Shami, I. Z., Al-Hamzi, M. A., Al-Shamahy, H. A. and Majeed, A. L. A. 2019. Efficacy of some antibiotics against *S.mutans* associated with tooth decay in children and their mothers. On. J. Dent. and Oral Health, 2: 21.

Alves, L. A., de Carli, T. R., Harth-Chu, E. N., Mariano, F. S., Höfling, J. F., Stipp, R. N. and mattos-graner, R. O. 2019. Oral streptococci show diversity in resistance to complement immunity. Journal of Medical Microbiology, 68(4): 600-608.

Ardal, C., Balasegaram, M., Laxminarayan, R., McAdams, D., Outterson, K., Rex, J. H. and Sumpradit, N. 2020. Antibiotic development-economic, regulatory and societal challenges. Nature Reviews Microbiology, 18(5): 267-274.

Atlas, R. M. and Snyder. J.w. 2006. Handbook of media for clinical microbiology. 2 nd . LLC CRC press.

Ayivi, R. D., Gyawali, R., Krastanov, A., Aljaloud, S. O., Worku, M., Tahergorabi, R. and Ibrahim, S. A. 2020. *L.acid* bacteria: Food safety and human health applications. Dairy, 1(3): 202-232.

Banerjee, D., Shivapriya, P. M., Gautam, P. K., Misra, K., Sahoo, A. K. and Samanta, S. K. 2020. A review on basic biology of bacterial biofilm infections and their treatments by nanotechnology-based approaches. Proceedings of the national academy of sciences, India section B: Biological Sciences, (90): 243-259.

Bedoya-Correa, C. M., Rodríguez, R. J. R. and Parada-Sanchez, M. T. 2019. Genomic and phenotypic diversity of *S.mutans*. Journal of Oral Biosciences, 61(1): 22-31.

Behnsen, J., Deriu, E., Sassone-Corsi, M. and Raffatellu, M. 2013. Probiotics: Properties, examples, and specific applications. Cold spring harbor perspectives in medicine, 3(3): a010074.

Bhattacharya, P. T., Misra, S. R. and Hussain, M. 2016. Nutritional aspects of essential trace elements in oral health and disease: An extensive review. Scientifica, 2: 16.

Bowen, W. H., Burne, R. A., Wu, H. and Koo, H. 2018. Oral biofilms: Pathogens, matrix, and polymicrobial interactions in microenvironments. Trends in Microbiology, 26(3): 229-242.

Braga MP, Augusta P, Natália V, Maciel SM, de Andrade FB and Poli-Frederico RC. 2013. Genotypic diversity and virulence factors of *S.mutans* in Cariesfree and caries-active individuals. Brazilian Archives of Biology and Technology, 56: 241-248.

Cagetti, M. G., Mastroberardino, S., Milia, E., Cocco, F., Lingström, P. and Campus, G. 2013. The use of probiotic strains in caries prevention: A systematic review. Nutrients, 5(7): 2530-2550.

Camanocha, A. and Dewhirst, F. E. 2014. Host-associated bacterial taxa from Chlorobi, Chloroflexi, GN02, Synergistetes, SR1, TM7, and WPS-2 Phyla/candidate divisions. Journal of Oral Microbiology, 6(1): 25468.

Carvalho, K. G., Bambirra, F. H., Nicoli, J. R., Oliveira, J. S., Santos, A. M., Bemquerer, M. P. and Franco, B. D. 2018. Characterization of multiple antilisterial peptides produced by sakacin P-producing *L.sakei* subsp. sakei 2a. Archives of Microbiology, 200: 635-644.

Castro, M. P., Palavecino, N. Z., Herman, C., Garro, O. A. and Campos, C. A. 2011. *L. acid* bacteria isolated from artisanal dry sausages: Characterization of antibacterial compounds and study of the factors affecting bacteriocin production. Meat Science, 87(4): 321-329.

Chapple, I. L., Bouchard, P., Cagetti, M. G., Campus, G., Carra, M. C., Cocco, F. and Schulte, A. G. 2017. Interaction of lifestyle, behaviour or systemic diseases with dental caries and periodontal diseases: Consensus report of group 2 of the joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal diseases. Journal of Clinical Periodontology, 44: S39-S51.

Chouirfa, H., Bouloussa, H., Migonney, V. and Falentin-Daudré, C. 2019. Review of titanium surface modification techniques and coatings for antibacterial applications. Acta Biomaterialia, 83: 37-54.

Colombo, A. P. V. and Tanner, A. C. R. 2019. The role of bacterial biofilms in dental caries and periodontal and peri-implant diseases: A historical perspective. Journal of Dental Research, 98(4): 373-385.

Costa Oliveira, B. E., Ricomini Filho, A. P., Burne, R. A. and Zeng, L. 2021. The route of sucrose utilization by *S.mutans* affects intracellular polysaccharide metabolism. Frontiers in Microbiology, 12: 636684.

Costa, E. M., Silva, S., Veiga, M., Tavaria, F. K. and Pintado, M. M. 2017. A review of chitosan's effect on oral biofilms: Perspectives from the tube to the mouth. Journal of Oral Biosciences, 59(4): 205-210.

Crenshaw, K. W. 2017. Race, reform, and retrenchment: Transformation and legitimation in antidiscrimination law. In law and social movements, pp. 475-531, Routledge.

Cruvinel, T., Ayala Aguirre, P. E., Lotto, M., Marchini Oliveira, T., Rios, D. and Pereira Cruvinel, A. F. 2019. Digital behavior surveillance: Monitoring dental caries and toothache interests of google users from developing countries. Oral Diseases, 25(1): 339-347.

Daboor, S. M., Masood, F. S. S., Al-Azab, M. S. and Nori, E. E. 2015. A review on *S.mutans* with its diseases dental caries, dental plaque and endocarditis. Indian J Microbiol Res, 2(2): 76-82.

Dai, L., Sahin, O., Grover, M. and Zhang, Q. 2020. New and alternative strategies for the prevention, control, and treatment of antibiotic-resistant campylobacter. Translational Research, 223: 76-88.

Darby, M. L. and Walsh, M. 2010. Dental hygiene: Theory and practice (3rd ed.). St. Louis, MO: Elsevier Health Sciences.

De Souza Rodrigues, J. Z., Passos, M. R., de Macêdo Neres, N. S., Almeida, R. S., Pita, L. S., Santos, I. A. And Yatsuda, R. 2020. Antimicrobial activity of *L. fermentum* TcUESC01 against *S.mutans* UA159. Microbial Pathogenesis, 142: 104063.

De, A., Liao, S., Bitoun, J. P., Roth, R., Beatty, W. L., Wu, H. and Wen, Z. T. 2017. Deficiency of RgpG causes major defects in cell division and biofilm formation, and deficiency of LytR-CpsA-Psr family proteins leads to accumulation of cell wall antigens in culture medium by *S.mutans*. Applied and Environmental Microbiology, 83(17): e00928-17.

Deglovic, J., Majtanova, N. and Majtan, J. 2022. Antibacterial and antibiofilm effect of honey in the prevention of dental caries: A recent perspective. Foods, 11(17): 2670.

Delfani, S., Mohammadrezaei-Khorramabadi, R., Ghamari, S., Boroujeni, R. K., Khodabandeloo, N., Khorzoughi, M. G. and Shahsavari, S. 2017. Systematic review for phytotherapy in *S.mutans*. Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 9(5): 552.

Deo, P. N. and Deshmukh, R. 2019. Oral microbiome: Unveiling the fundamentals. Journal of oral and maxillofacial pathology: JOMFP, 23(1): 122.

Dewhirst, F. E., Chen, T., Izard, J., Paster, B. J., Tanner, A. C., Yu, W. H. and Wade, W. G. 2010. The human oral microbiome. Journal of Bacteriology, 192(19): 5002-5017.

Dhumal, P., Bajpai, S., Garge, N., Bhatt, A., Rampurwala, F., Sulaimani, N. and Deshmukh, R. 2022. Antimicrobial resistance and virulence of *E.coli* in the Purview of Public Health Monitoring.

Dicks, L. M., Dreyer, L., Smith, C. and Van Staden, A. D. 2018. A review: the fate of bacteriocins in the human gastro-intestinal tract: Do they cross the gut–blood barrier. Frontiers in Microbiology, 9: 2297.

Do, L. G. and Australian research centre for population oral health. 2020. Guidelines for use of fluorides in Australia: Update 2019. Australian Dental Journal, 65(1): 30-38.

Doern, C. D. and Carey-Ann, B. D. 2010. It's not easy being green: The viridans group *streptococci*, with a focus on pediatric clinical manifestations. Journal of Clinical Microbiology, 48(11): 3829-3835.

Fernandes Probst, L., de Fátima Barros Cavalcante, D., Vanni, T., da Silva, E. T. and Pereira, A. C. 2020. Health technology assessment as a tool to support decision-making in public and universal oral health care. JBES: Brazilian Journal of Health Economics/Jornal Brasileiro de economia da Saúde, 1: 21.

Fernandes, T., Bhavsar, C., Sawarkar, S. and D'souza, A. 2018. Current and novel approaches for control of dental biofilm. International Journal of Pharmaceutics, 536(1): 199-210.

Flayyih, A. S., Hassani, H. H. and Wali, M. H. 2016. Identification of *S.mutans* from human dental plaque and dental caries using *16s rRna* gene. Iraqi Journal of Science, 4: 552-557.

Forssten, S. D., Björklund, M. and Ouwehand, A. C. 2010. *S.mutans*, caries and simulation models. J. Nutrients. 2: 290-298.

Freire, M., Nelson, K. E. and Edlund, A. 2021. The oral host–microbial interactome: An ecological chronometer of health?. Trends in Microbiology, 29(6): 551-561.

GBD 2017 oral disorders collaborators, Bernabe, E., Marcenes, W., Hernandez, C. R., Bailey, J., Abreu, L. G. and Kassebaum, N. J. 2020. Global, regional, and national levels and trends in burden of oral conditions from 1990 to 2017: A systematic analysis for the global burden of disease 2017 study. Journal of Dental Research, 99(4): 362-373.

GC, B., Sahukhal, G. S. and Elasri, M. O. 2019. Role of the msaABCR operon in cell wall biosynthesis, autolysis, integrity, and antibiotic resistance in *S.aureus*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 63(10): e00680-19.

George, B., John, J., Saravanan, S., Arumugham, I. M. and Johny, M. K. 2015. Dental caries status of inmates in central prison, chennai, Tamil Nadu, india. Journal of Natural Science, Biology, and Medicine, 6(1): S110.

Giacaman, R. A., Muñoz-Sandoval, C., Neuhaus, K., Fontana, M. and Chałas, R. 2018. Evidence-based strategies for the minimally invasive treatment of carious lesions: Review of the literature. Advances in Clinical and Experimental Medicine, 27(7): 1009-1016.

Gil-Montoya, J. A., Ferreira de Mello, A. L., Barrios, R., Gonzalez-Moles, M. A. and Bravo, M. 2015. Oral health in the elderly patient and its impact on general well-being: a nonsystematic review. Clinical Interventions in Aging, 5: 461-467.

Gisriel, S. D., Yuan, J., Braunberger, R. C., Maracaja, D. L., Chen, X., Wu, X. and Pan, Z. 2022. Human herpesvirus 8-negative effusion-based large B-cell lymphoma: A distinct entity with unique clinicopathologic characteristics. Modern Pathology, 1: 1-12.

Gowrishankar, S., Poornima, B. and Pandian, S. K. 2014. Inhibitory efficacy of cyclo (l-leucyl-l-prolyl) from mangrove rhizosphere bacterium–*Bacillus*

amyloliquefaciens (MMS-50) toward cariogenic properties of *S.mutans*. Research in Microbiology, 165(4): 278-289.

Guo, L., Wu, T., Hu, W., He, X., Sharma, S., Webster, P. and Shi, W. 2017. Phenotypic characterization of the foldase homologue Prs a in *S.mutans*. Molecular Oral Microbiology, 28(2): 154-165.

Ham, S. Y., Kim, H. S., Cha, E., Lim, T., Byun, Y. and Park, H. D. 2022. Raffinose inhibits *S.mutans* biofilm formation by targeting *Glucosyltransferase*. Microbiology Spectrum, 10(3): e02076-21.

Hao, Y., Huang, X., Zhou, X., Li, M., Ren, B., Peng, X. and Cheng, L. 2018. Influence of dental prosthesis and restorative materials interface on oral biofilms. International Journal of Molecular Sciences, 19(10): 3157.

Heikenfeld, J., Jajack, A., Feldman, B., Granger, S. W., Gaitonde, S., Begtrup, G. and Katchman, B. A. 2019. Accessing analytes in biofluids for peripheral biochemical monitoring. Nature Biotechnology, 37(4): 407-419.

Hemadi, A. S., Huang, R., Zhou, Y. and Zou, J. 2017. Try proteins and microbiota as biomarkers for early childhood caries risk assessment. International Journal of Oral Science, 9(11): e1-e1.

Hernández-Durán, M., López-Jácome, L. E., Colín-Castro, C. A., Cerón-González, G., Ortega-Peña, S., Vanegas-Rodríguez, E. S. and Franco-Cendejas, R. 2017. Comparison of the microScan walkaway and VITEK 2 compact systems for the identification and susceptibility of clinical gram-positive and gram-negative bacteria. Investigación en Discapacidad, 6(3): 105-114.

Horst, J. A., Tanzer, J. M. and Milgrom, P. M. 2018. Fluorides and other preventive strategies for tooth decay. Dental Clinics, 62(2): 207-234.

Hoshino, T. and Fujiwara, T. 2022. The findings of *glucosyltransferase* enzymes derived from oral *streptococci*. Japanese Dental Science Review, 58: 328-335.

Hu, X., Ayed, C., Chen, J., Fisk, I. and Yang, N. 2022. The role of capsaicin stimulation on the physicochemical properties of saliva and aroma release in model aqueous and oil systems. Food Chemistry, 386: 132824.

Ihara, Y., Takeshita, T., Kageyama, S., Matsumi, R., Asakawa, M., Shibata, Y. and Yamashita, Y. 2019. Identification of initial colonizing bacteria in dental plaques

from young adults using full-length *16S rRNA* gene sequencing. Msystems, 4(5): e00360-19.

Jakubovics, N. S., Goodman, S. D., Mashburn- Warren, L., Stafford, G. P. and Cieplik, F. 2021. The dental plaque biofilm matrix. Periodontology 2000, 86(1): 32-56.

Jans, C., Meile, L., Lacroix, C. and Stevens, M. J. 2015. Genomics, evolution, and molecular epidemiology of the *Streptococcus* bovis/*Streptococcus* equinus complex (SBSEC). Infection, Genetics and Evolution, 33: 419-436.

Jenssen, H., Hamill, P. and Hancock, R. E. 2006. Peptide antimicrobial agents. Clinical Microbiology Reviews, 19(3): 491-511.

Jepsen, S., Blanco, J., Buchalla, W., Carvalho, J. C., Dietrich, T., Dörfer, C. and Machiulskiene, V. 2017. Prevention and control of dental caries and periodontal diseases at individual and population level: Consensus report of group 3 of joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal diseases. Journal of Clinical Periodontology, 44: S85-S93.

Jevtić, M., Pantelinac, J., Jovanović-Ilić, T., Petrović, V., Grgić, O. and Blažić, L. 2015. The role of nutrition in caries prevention and maintenance of oral health during pregnancy. Medicinski Pregled, 68(11-12): 387-393.

Jozala, A. F., de Lencastre Novaes, L. C. and Junior, A. P. 2015. Nisin. In concepts, compounds and the alternatives of antibacterials. Intechopen, 2: 7.

Juturu and Wu, J. C. 2018. Microbial production of bacteriocins: Latest research development and applications. Biotechnology Advances, 36(8): 2187-2200.

Kareb, O. and Aïder, M. 2019. Whey and its derivatives for probiotics, prebiotics, synbiotics, and functional foods: A critical review. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 11, 348-369.

Kidd, E. A. M. and Fejerskov, O. 2016. Essentials of dental caries. Oxford university Press.

Kilian, M., Chapple, I. L. C., Hannig, M., Marsh, P. D., Meuric, V., Pedersen, A. M. L. and Zaura, E. 2016. The oral microbiome–an update for oral healthcare professionals. British Dental Journal, 221(10): 657-666.

Kitamoto, S., Nagao-Kitamoto, H., Hein, R., Schmidt, T. M. and Kamada, N. 2020. The bacterial connection between the oral cavity and the gut diseases. Journal of Dental Research, 99(9): 1021-1029.

Klein, E. Y., Van Boeckel, T. P., Martinez, E. M., Pant, S., Gandra, S., Levin, S. A. and Laxminarayan, R. 2018. Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015. Proceedings of the National Academy of Sciences, 115(15): E3463-E3470.

Klein, M. I. 2022. Oral Streptococci. In molecular typing in bacterial infections, Volume I, pp. 125-137, Springer, Cham.

Klein, M. I., Hwang, G., Santos, P. H., Campanella, O. H. and Koo, H. 2015. *S.mutans*-derived extracellular matrix in cariogenic oral biofilms. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 5: 10.

Koning, J. W. 2010. Interactions Between *S.mutans* and Veillonella dispar. PhD thesis, London University, 58 page, London.

Kreikemeyer, B., Gámez, G., Margarit, I., Giard, J. C., Hammerschmidt, S., Hartke, A. and Podbielski, A. 2011. Genomic organization, structure, regulation and pathogenic role of pilus constituents in major pathogenic *Streptococci* and *Enterococci*. International Journal of Medical Microbiology, 301(3): 240-251.

Krzysciak, W., Jurczak, A., Kościelniak, D., Bystrowska, B. and Skalniak, A. 2014. The virulence of *S.mutans* and the ability to form biofilms. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 33: 499-515.

Kuryłek, A., Stasiak, M. and Kern-Zdanowicz, I. 2022. Virulence factors of *S.anginosus*-a molecular perspective. Frontiers in Microbiology, 1: 3.

Lamonet, R. J. and Jenkinson H. F. 2019 .Oral microbiology at a glance 1st ed,. John Wiley and Sons. UK.

Lamont, R. J., Koo, H. and Hajishengallis, G. 2018. The oral microbiota: Dynamic communities and host interactions. Nature Reviews Microbiology, 16(12): 745-759.

Lee, K., Walker, A. R., Chakraborty, B., Kaspar, J. R., Nascimento, M. M. and Burne, R. A. 2019. Novel probiotic mechanisms of the oral bacterium *Streptococcus sp*. A12 as explored with functional genomics. Applied and Environmental Microbiology, 85(21): e01335-19.

Lee, S. H., Choi, B. K. and Kim, Y. J. 2012. The cariogenic characters of xylitol-resistant and xylitol-sensitive *S.mutans* in biofilm formation with salivary bacteria. Archives of Oral Biology, 57(6): 697-703.

Leelaruangsang, S., Ayudhya, P. C. N., Aroonrerk, N. and Aroonrerk, N. 2021. Inhibition of biofilm formation from *S.mutans* by mouthwashes in vitro. International Journal, 4(4): 1037.

Léger, L., Budin-Verneuil, A., Cacaci, M., Benachour, A., Hartke, A. and Verneuil, N. 2019. β-lactam exposure triggers reactive oxygen species formation in enterococcus faecalis via the respiratory chain component DMK. Cell reports, 29(8): 2184-2191.

Lemos, J. A., Palmer, S. R., Zeng, L., Wen, Z. T., Kajfasz, J. K., Freires, I. A. and Brady, L. J. 2019. The biology of *S.mutans*. Microbiology Spectrum, 7(1): 7-1.

Lencina, A. M., Franza, T., Sullivan, M. J., Ulett, G. C., Ipe, D. S., Gaudu, P. and Schurig-Briccio, L. A. 2018. Type 2 NADH dehydrogenase is the only point of entry for electrons into the *Streptococcus* agalactiae respiratory chain and is a potential drug target. MBio, 9(4): e01034-18.

Lescure, D., Paget, J., Schellevis, F. and Van Dijk, L. 2018. Determinants of self-medication with antibiotics in european and anglo-saxon countries: A systematic review of the literature. Frontiers in Public Health, 6: 370.

Li, J., Wu, T., Peng, W. and Zhu, Y. 2020. Effects of resveratrol on cariogenic virulence properties of *S.mutans*. BMC Microbiology, 20(1): 1-11.

Lipsky, M. S., Su, S., Crespo, C. J. and Hung, M. 2021. Men and oral health: A review of sex and gender differences. American Journal of Men's Health, 15(3): 15579883211016361.

Liu, R., Memarzadeh, K., Chang, B., Zhang, Y., Ma, Z., Allaker, R. P. and Yang, K. 2016. Antibacterial effect of copper-bearing titanium alloy (Ti-Cu) against *S.mutans* and porphyromonas gingivalis. Scientific Reports, 6(1): 1-10.

Ma, Q., Pan, Y., Chen, Y., Yu, S., Huang, J., Liu, Y. and Li, Y. 2021. Acetylation of *glucosyltransferases* regulates *S.mutans* biofilm formation and virulence. PLoS Pathogens, 17(12): e1010134.

Mac Fadden, J. 2000. Biochemical tests for identification of medical bacteria 3rded. The Williams and Wilkins Co., USA. pp: 689 - 691.

Machiulskiene, V., Campus, G., Carvalho, J. C., Dige, I., Ekstrand, K. R., Jablonski-Momeni, A. and Nyvad, B. 2020. Terminology of dental caries and dental caries

management: Consensus report of a workshop organized by ORCA and cariology research group of IADR. Caries Research, 54(1): 7-14.

Mahlapuu, M., Håkansson, J., Ringstad, L. and Björn, C. 2016. Antimicrobial peptides: An emerging category of therapeutic agents. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 1: 94.

Malheiros, P. S., Sant'Anna, V., Todorov, S. D. and Franco, B. D. 2015. Optimization of growth and bacteriocin production by *L.sakei* subsp. sakei2a. Brazilian Journal of Microbiology, 46: 825-834.

Mamai-Homata, E., Koletsi-Kounari, H. and Margaritis, V. 2016. Gender differences in oral health status and behavior of greek dental students: A meta-analysis of 1981, 2000, and 2010 data. Journal of International Society of Preventive and Community Dentistry, 6(1): 60.

Mark Welch, J. L., Rossetti, B. J., Rieken, C. W., Dewhirst, F. E. and Borisy, G. G. 2016. Biogeography of a human oral microbiome at the micron scale. Proceedings of the National Academy of Sciences, 113(6): E791-E800.

Mathew, M. G., Samuel, S. R., Soni, A. J. and Roopa, K. B. 2020. Evaluation of adhesion of *S.mutans*, plaque accumulation on zirconia and stainless steel crowns, and surrounding gingival inflammation in primary molars: Randomized controlled trial. Clinical Oral Investigations, 24(9): 3275-3280.

Matsumoto-Nakano, M. 2018. Role of *S. mutans* surface proteins for biofilm formation. Japanese Dental Science Review, 54(1): 22-29.

Meade, E., Slattery, M. A. and Garvey, M. 2020. Bacteriocins, potent antimicrobial peptides and the fight against multi drug resistant species: Resistance is futile. Antibiotics, 9(1): 32.

Merk, M. L., Schur, C. L. and Cantor, J. C. 1995. Ability to obtain health care: Recent estimates from the Robert Wood Johnson Foundation national access to care survey. Health aff (Millwood), 14: 139-146.

Mocan, T., Matea, C. T., Pop, T., Mosteanu, O., Buzoianu, A. D., Suciu, S. and Mocan, L. 2017. Carbon nanotubes as anti-bacterial agents. Cellular and Molecular Life Sciences, 74(19): 3467-3479.

Mokoena, M. P. 2017. *L.acid* bacteria and their *bacteriocins*:Classification, biosynthesis and applications against uropathogens: A mini-review. Molecules, 22(8): 1255.

Mueller, C. D., Schur, C. L. and Paramore, L. C. 1998. Access to dental care in the united states: Estimates from a 1994 survey. J Am Dent Assoc, 129: 429-437.

Nakamura, T., Iwabuchi, Y., Hirayama, S., Narisawa, N., Takenaga, F., Nakao, R. and Senpuku, H. 2020. Roles of membrane vesicles from *S. mutans* for the induction of antibodies to *glucosyltransferase* in mucosal immunity. Microbial Pathogenesis, 149: 104260.

Nakano, M. M., Fujita, K. and Ooshima, T. 2009. Comparison of glucan-binding proteins in cariogenicity of *S.mutans*. Oral. Microbiol. Immunol, 22(1): 30-35.

Naraki, S., Igimi, S. and Sasaki, Y. 2020. NADH peroxidase plays a crucial role in consuming H2O2 in *Lactobacillus* casei IGM394. Bioscience of Microbiota, Food and Health, 39(2): 45-56.

Nicolas, G. G., LaPointe, G. and Lavoie, M. C. 2011. Production, purification, sequencing and activity spectra of mutacins D-123.1 and F59.1. J. BMC Microbiology, 1: 11:

Nijampatnam, B., Ahirwar, P., Pukkanasut, P., Womack, H., Casals, L., Zhang, H. and Velu, S. E. 2020. Discovery of potent inhibitors of *S. mutans* biofilm with antivirulence activity. ACS Medicinal Chemistry Letters, 12(1): 48-55.

Onwuakor, C. E., Ogbulie, J. N., Braide, W., Ogbulie, T. E., Nwokafor, C. V. and Uchendu, C. E. 2020. Optimization of culture conditions for enhanced bacteriocin production by *L.lactis* MT186647 using response surface methodology. American Journal of Microbiological Research, 8(4): 110-116.

Papadimitriou, K., Alegría, Á., Bron, P. A., De Angelis, M., Gobbetti, M., Kleerebezem, M. and Kok, J. 2016. Stress physiology of *L.acid* bacteria. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 80(3): 837-890.

Parapouli, M., Delbès-Paus, C., Kakouri, A., Koukkou, A. I., Montel, M. C. and Samelis, J. 2013. Characterization of a wild, novel nisin a-producing *Lactococcus* strain with an *L. lactis* subsp. Cremoris genotype and an *L. lactis* subsp. *Lactis* phenotype, isolated from greek raw milk. Applied and Environmental Microbiology, 79(11): 3476-3484.

Park, M., Sutherland, J. B. and Rafii, F. 2019. Effects of nano-hydroxyapatite on the formation of biofilms by *S.mutans* in two different media. Archives of Oral Biology, 107: 104484.

Parmanand, B. A., Kellingray, L., Le Gall, G., Basit, A. W., Fairweather-Tait, S. and Narbad, A. 2019. A decrease in iron availability to human gut microbiome reduces the growth of potentially pathogenic gut bacteria; An in vitro colonic fermentation study. The Journal of Nutritional Biochemistry, 67: 20-27.

Patel, S. and Gupta, R. S. 2018. Robust demarcation of fourteen different species groups within the genus *Streptococcus* based on genome-based phylogenies and molecular signatures. Infection, Genetics and Evolution, 66: 130-151.

Peng, Z., Xiong, T., Huang, T., Xu, X., Fan, P., Qiao, B. and Xie, M. 2022. Factors affecting production and effectiveness, performance improvement and mechanisms of action of bacteriocins as food preservative. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 1: 1-14.

Peres, M. A., Macpherson, L. M., Weyant, R. J., Daly, B., Venturelli, R., Mathur, M. R. and Watt, R. G. 2019. Oral diseases: A global public health challenge. The lancet, 394 (10194): 249-260.

Petersen, P. E. and Ogawa, H. 2016. Prevention of dental caries through the use of fluoride-the WHO approach. community dent health, 33(2): 66-68.

Peterson, S. N., Snesrud, E., Schork, N. J. and Bretz, W. A. 2011. Dental caries pathogenicity: A genomic and metagenomic perspective. International Dental Journal, 61: 11-22.

Pitts, N. B., Zero, D. T., Marsh, P. D., Ekstrand, K., Weintraub, J. A., Ramos-Gomez, F. and Ismail, A. 2017. Dental caries. Nature Reviews Disease Primers, 3(1): 1-16.

Pontigo, F., Moraga Vergara, M. and Flores Carrasco, S. 2015. Molecular phylogeny and a taxonomic proposal for the genus *Streptococcus*. Journal of Applied Oral Science, 2: 15-16.

Prado, M., Silva, E. J. N. L. D., Duque, T. M., Zaia, A. A., Ferraz, C. C. R., Almeida, J. F. A. D. and Gomes, B. P. F. D. A. 2015. Antimicrobial and cytotoxic effects of phosphoric acid solution compared to other root canal irrigants. Journal of Applied Oral Science, 23: 158-163.

Prados-Privado, M., García Villalón, J., Martínez-Martínez, C. H., Ivorra, C. and Prados-Frutos, J. C. 2020. Dental caries diagnosis and detection using neural networks: A systematic review. Journal of Clinical Medicine, 9(11): 3579.

Prithika, U. and Balamurugan, K. 2018. *Streptococcus* and *Streptococcal* Toxins. In handbook of foodborne diseases, pp. 223-232, Taylor and Francis Group, 6000 broken sound parkway NW, Suite 300, Boca Raton, FL 33487-2742: CRC Press.

Quan, T. P., Muller-Pebody, B., Fawcett, N., Young, B. C., Minaji, M., Sandoe, J. and Walker, A. S. 2020. Investigation of the impact of the NICE guidelines regarding antibiotic prophylaxis during invasive dental procedures on the incidence of infective endocarditis in England: An electronic health records study. BMC Medicine, 18(1): 1-17.

Raji, M. A., Jamal, W., Ojemhen, O. and Rotimi, V. O. 2013. Point-surveillance of antibiotic resistance in Enterobacteriaceae isolates from patients in a lagos teaching hospital, nigeria. Journal of İnfection and Public Health, 6(6): 431-437.

Rampini, S. K., Bloemberg, G. V., Keller, P. M., Büchler, A. C., Dollenmaier, G., Speck, R. F. and Böttger, E. C. 2017. Broad-range *16S rRNA* gene polymerase chain reaction for diagnosis of culture-negative bacterial infections. Clinical Infectious Diseases, 53(12): 1245-1251.

Ranganathan, V. and Akhila, C. H. 2019. *S.mutans*: Has it become prime perpetrator for oral manifestations. J Microbiol Exp, 7(4): 207-213.

Rathee, M. and Sapra, A. 2019. Dental Caries. Oral Health Prev Dent, 1: 3-8.

Reddy, P., Krithikadatta, J., Srinivasan, V., Raghu, S. and Velumurugan, N. 2020. Dental caries profile and associated risk factors among adolescent school children in an urban South-Indian city. Oral Health Prev Dent, 18(1): 379-86.

Ren, Z., Chen, L., Li, J. and Li, Y. 2016 A. Inhibition of *S.mutans* polysaccharide synthesis by molecules targeting glycosyltransferase activity. Journal of Oral Microbiology, 8(1): 31095.

Ren, Z., Cui, T., Zeng, J., Chen, L., Zhang, W., Xu, X. and Li, Y. 2016 B. Molecule targeting *glucosyltransferase* inhibits *S.mutans* biofilm formation and virulence. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 60(1): 126-135.

Rezaei, T., Mehramouz, B., Gholizadeh, P., Yousefi, L., Ganbarov, K., Ghotaslou, R. and Kafil, H. S. 2022. Factors associated with *S. mutans* pathogenicity in the oral cavity.

Richards, V. P., Palmer, S. R., Pavinski Bitar, P. D., Qin, X., Weinstock, G. M., Highlander, S. K. and Stanhope, M. J. 2014. Phylogenomics and the dynamic

genome evolution of the genus *Streptococcus.* Genome Biology and Evolution, 6(4): 741-753.

Righolt, A. J., Jevdjevic, M., Marcenes, W. and Listl, S. 2018. Global-, regional-, and country-level economic impacts of dental diseases in 2015. Journal of Dental Research, 97(5): 501-507.

Rikhtegaran, S., Ajami, A. A., Kimyai, S., Jafari, E., Khayam, L., Rahbar, M. and Pirzadeh, T. 2016. Inactivation of *S.mutans* using photo-activated disinfection therapy with methylene blue and indocyanine green photosensitizers. Journal of International Oral Health, 8(7): 747-752.

Rosing, K., Christensen, L. B. and Damgaard, C. 2022. Periodontal care attendance in Denmark in 2012–2016–a nationwide register-based study. Acta Odontologica Scandinavica, 80(4): 264-272.

Rossoni, R. D., dos Santos Velloso, M., de Barros, P. P., de Alvarenga, J. A., Dos Santos, J. D., dos Santos Prado, A. C. C. and Junqueira, J. C. 2018. Inhibitory effect of probiotic *Lactobacillus* supernatants from the oral cavity on *S. mutans* biofilms. Microbial Pathogenesis, 123: 361-367.

Saleh, R. O., Mohammed, T. K., Abdulmuhsen, A. M. and Jwad, M. A. 2019. Variation of GTF*D* Gene from *S.mutans* local isolate from iraqi patients. Indian J Public Health, 10: 189.

Salehizadeh, M., Salehi, M. and Falahiyan, M. R. 2016. Frequency and expression of mutacin and putative bacteriocin genes in isolated *S.mutans* and its antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative bacteria. Molecular and Biochemical Diagnosis Journal, 2(1): 27-41.

Salvadori, G., Junges, R., Morrison, D. A. and Petersen, F. C. 2019. Competence in *S.pneumoniae* and close commensal relatives: Mechanisms and implications. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 9: 94.

Samedi, L. and Charles, A. L. 2019. Evaluation of technological and probiotic abilities of local l.acid bacteria. Journal of Applied and Environmental Microbiology, 7(1): 9-19.

Saura-Moreno, C., Cortés-Arcas, M. V., Fernandez-Meseguer, A., Calvo-Bonacho, E. and Llodra-Calvo, J. C. 2017. Root caries analysis in working population of 35-44 years of age (Spain). Medicina Oral, Patologia Oral y Cirugia Bucal, 22(5): e527.

Schenkel, M. A., Billeter, J. C., Beukeboom, L. W. and Pen, I. 2022. Divergent evolution of genetic sex determination mechanisms along environmental gradients. Biorxiv.

Selvaraj, C., Priya, R. B., Lee, J. K. and Singh, S. K. 2015. Mechanistic insights of SrtA–LPXTG blockers targeting the transpeptidase mechanism in *S.mutans*. RSC Advances, 5(122): 100498-100510.

Sender, R., Fuchs, S. and Milo, R. 2016. Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. PLoS Biology, 14(8): e1002533.

Shaffer, J. R., Wang, X., McNeil, D. W., Weyant, R. J., Crout, R. and Marazita, M. L. 2015. Genetic susceptibility to dental caries differs between the sexes: A family-based study. Caries Research, 49(2): 133-140.

Shafiei, Z., Rahim, Z. H. A., Philip, K., Thurairajah, N. and Yaacob, H. 2020. Potential effects of *psidium* sp., *mangifera* sp., *mentha* sp. and its mixture (PEM) in reducing bacterial populations in biofilms, adherence and acid production of *S. sanguinis* and *S. mutans*. Archives of Oral Biology, 109: 104554.

Shyam, N. and Cohen, B. A. 2021. Oral Cavity. Pediatric dermatology E-book, 2: 60.

Simons, A., Alhanout, K. and Duval, R. E. 2020. Bacteriocins, antimicrobial peptides from bacterial origin: Overview of their biology and their impact against multidrug-resistant bacteria. Microorganisms, 8(5): 639.

Sims Jr, K. R. 2019. Advancing anti-biofilm nanoparticle drug delivery systems. University of Rochester. Archives of Oral Biology, 4: 87.

Sivapathasundharam, B. and Raghu, A. R. 2020. Dental caries. In shafer's textbook of oral pathology: Ninth edition, pp. 369-403, Elsevier.

Sizova, M. V., Hohmann, T., Hazen, A., Paster, B. J., Halem, S. R. and Murphy, C. M. 2012. New approaches for isolation of previously uncultivated oral bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 78: 194–203.

Soldani, F. A., Lamont, T., Jones, K., Young, L., Walsh, T., Lala, R. and Clarkson, J. E. 2018. One- to- one oral hygiene advice provided in a dental setting for oral health. Cochrane Database of Systematic Reviews, 1: 10.

Sultan, A. S., Kong, E. F., Rizk, A. M. and Jabra-Rizk, M. A. 2018. The oral microbiome: A lesson in coexistence. PLoS Pathogens, 14(1): e1006719.

Tagg, J. R., Wescombe, P. A., Hale, J. D. and Burton, J. P. 2019. *Streptococcus*: A brief update on the current taxonomic status of the genus. In *L.Acid* Bacteria, pp. 87-107, CRC press.

Tanner, A. C. R., Kressirer, C. A., Rothmiller, S., Johansson, I. and Chalmers, N. I. 2018. The caries microbiome: Implications for reversing dysbiosis. Advances in Dental Research, 29(1): 78-85.

Tatevossian, A. 2019. Film fermenters in dental research. In CRC handbook of laboratory model systems for microbial ecosystems, pp. 197-227, CRC press.

Teixeira, L. M., Carvalho, M. D. G. S., Facklam, R. R. and Shewmaker, P. L. 2015. *Enterococcus*. Manual of Clinical Microbiology, 3(5): 403-421.

Tonetti, M. S., Bottenberg, P., Conrads, G., Eickholz, P., Heasman, P., Huysmans, M. C. and Paris, S. 2017. Dental caries and periodontal diseases in the ageing population: Call to action to protect and enhance oral health and wellbeing as an essential component of healthy ageing–consensus report of group 4 of the joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal diseases. Journal of Clinical Periodontology, 44: S135-S144.

Tsuda, H., Yamashita, Y., Shibata, Y., Nakano, Y. and Koga, T. 2002. Genes involved in bacitracin resistance in *Streptococcus mutans*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 46(12): 3756-3764.

Twetman, S. 2012. Are we ready for caries prevention through bacteriotherapy. Brazilian Oral Research, 26: 64-70.

US Department of health and human services. 2013. Reports of the surgeon general, US public health service. Microbial Drug Resistance, 1: 9.

Vacharaksa, A., Suvansopee, P., Opaswanich, N. and Sukarawan, W. 2015. PCR detection of scardovia wiggsiae in combination with *S.mutans* for early childhood caries- risk prediction. European Journal of Oral Sciences, 123(5): 312-318.

Veiga, N. J., Aires, D., Douglas, F., Pereira, M., Vaz, A., Rama, L. and Bexiga, F. 2016. Dental caries: A review. Journal of Dental and Oral Health, 2(5): 1-3.

Vial, T. M. 2016. Modern religion, modern race. Oxford university press.

Vivas, R., Barbosa, A. A. T., Dolabela, S. S. and Jain, S. 2019. Multidrug-resistant bacteria and alternative methods to control them: An overview. Microbial Drug Resistance, 25(6): 890-908.

Vos, T., Abajobir, A. A., Abate, K. H., Abbafati, C., Abbas, K. M., Abd-Allah, F. and Criqui, M. H. 2017. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990–2016: A systematic analysis for the global burden of disease study 2016. The Lancet, 390(10100): 1211-1259.

Wang, H. and Ren, D. 2017. Controlling *S.mutans* and *S.aureus* biofilms with direct current and chlorhexidine. AMB Express, 7(1): 1-9.

Wang, P., Hou, C., Zhao, X., Tian, M., Gu, Z. and Yang, R. 2019 A. Molecular characterization of water-extractable arabinoxylan from wheat bran and its effect on the heat-induced polymerization of gluten and steamed bread quality. Food Hydrocolloids, 87: 570-581.

Wang, T. Z., Kodiyanplakkal, R. P. L. and Calfee, D. P. 2019 B. Antimicrobial resistance in nephrology. Nature Reviews Nephrology, 15(8): 463-481.

Wang, Y., Hoffmann, J. P., Baker, S. M., Bentrup, K. H. Z., Wimley, W. C., Fuselier, J. A. and Morici, L. A. 2021. Inhibition of *S.mutans* biofilms with bacterial-derived outer membrane vesicles. BMC Microbiology, 21(1): 1-12.

Watanabe, A., Kawada-Matsuo, M., Le, M. N. T., Hisatsune, J., Oogai, Y., Nakano, Y. and Komatsuzawa, H. 2021. Comprehensive analysis of bacteriocins in *S. mutans*. Scientific Reports, 11(1): 1-13.

Weinstein, M. P. and Lewis, J. S. 2020. The clinical and laboratory standards institute subcommittee on antimicrobial susceptibility testing: Background, organization, functions, and processes. Journal of Clinical Microbiology, 58(3): e01864-19.

Willis, J. R. and Gabaldón, T. 2020. The human oral microbiome in health and disease: From sequences to ecosystems. Microorganisms, 8(2): 308.

Wu, Y., Li, S., Tao, Y., Li, D., Han, Y., Show, P. L. and Zhou, J. 2021. Fermentation of blueberry and blackberry juices using *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus thermophilus* and *Bifidobacterium bifidum*: Growth of probiotics, metabolism of phenolics, antioxidant capacity in vitro and sensory evaluation. Food Chemistry, 348: 129083.

Yaacob, S. N., Wahab, R. A., Misson, M., Sabullah, M. K., Huyop, F. and Zin, N. M. 2022. *L. acid* bacteria and their bacteriocins: New potential weapons in the fight against methicillin-resistant *S.aureus*. Future Microbiology, 17(9): 683-699.

Yang, E., Fan, L., Yan, J., Jiang, Y., Doucette, C., Fillmore, S. and Walker, B. 2018. Influence of culture media, pH and temperature on growth and bacteriocin production of bacteriocinogenic *L. acid* bacteria. AMB Express, 8(1): 1-14.

Yang, K. M., Kim, J. S., Kim, H. S., Kim, Y. Y., Oh, J. K., Jung, H. W. and Bae, K. H. 2021. Lactobacillus reuteri AN417 cell-free culture supernatant as a novel antibacterial agent targeting oral pathogenic bacteria. Scientific Reports, 11(1): 1-16.

Yazdi, S. G., Geoghegan, P. H., Docherty, P. D., Jermy, M. and Khanafer, A. 2018. A review of arterial phantom fabrication methods for flow measurement using PIV techniques. Annals of Biomedical Engineering, 46(11): 1697-1721.

Yildiz, G., Ermis, R. B., Calapoglu, N. S., Celik, E. U. and Türel, G. Y. 2016. Gene-environment interactions in the etiology of dental caries. Journal of Dental Research, 95(1): 74-79.

Yolmeh, M. and Jafari, S. M. 2017. Applications of response surface methodology in the food industry processes. Food and Bioprocess Technology, 10(3): 413-433.

Yoo, S. Y., Kim, K. J., Lim, S. H., Kim, K. W., Hwang, H. K., Min, B. M., Choe, S. J. and Kook, J. K. 2005. FEMS Microbiol Lett. Journal of Dental Research, 249(2): 323-326.

Yoshizawa, J. M., Schafer, C. A., Schafer, J. J., Farrell, J. J., Paster, B. J. and Wong, D. T. 2013. Salivary biomarkers: Toward future clinical and diagnostic utilities. Clinical Microbiology Reviews, 26(4): 781-791.

Yumoto, H., Hirota, K., Hirao, K., Ninomiya, M., Murakami, K., Fujii, H. and Miyake, Y. 2019. The pathogenic factors from oral *Streptococci* for systemic diseases. International Journal of Molecular Sciences, 20(18): 4571.

Zezhang, T., David, Y., Sang-Joon, A. and Robert, A. 2019. Bioflim formation and virulence expression by *S.mutans* are altered when grown in dual-species model. BMC Microbiology, 10: 111.

Zhang, Q., Ma, Q., Wang, Y., Wu, H. and Zou, J. 2021. Molecular mechanisms of inhibiting glucosyltransferases for biofilm formation in *S.mutans*. International Journal of Oral Science, 13(1): 30.

Zhang, Z., Yang, Y., Sun, Q., Zeng, W. and Li, Y. 2022. Inhibition of biofilm formation and virulence factors of cariogenic oral pathogen *S.mutans* by shikimic acid. Microbiology Spectrum, 10(4): e01199-22.

Zhu, Y., Yan, J., Mujtaba, B. M., Li, Y., Wei, H. and Huang, S. 2021. The dual anti-caries effect of carboxymethyl chitosan nanogel loaded with chimeric lysin ClyR and amorphous calcium phosphate. European Journal of Oral Sciences, 129(3): e12784.

Zimina, M., Babich, O., Prosekov, A., Sukhikh, S., Ivanova, S., Shevchenko, M. and Noskova, S. 2020. Overview of global trends in classification, methods of preparation and application of bacteriocins. Antibiotics, 9(9): 553.

Zmora, N., Suez, J. and Elinav, E. 2019. You are what you eat: diet, health and the gut microbiota. Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology, 16(1): 35-56.

EKLER

EK 1. Etik kurul onayı

EK 1. Etik kurul onayı

T.C.
ANKARA 34. NOTERLİĞİ
Karanfil Sok. No. 19/3 Kızılay/ANKARA
Tel: 0312 425 46 40 - 419 60 30

Sayı: 791
Tarih: 25.04.2023

ÖZEL AL-BNOOK HASTANESİ

TERCÜME

Aşur Alcamiye Fakültesine
Konu/İşlemlerin Kolaylaştırılması

5795

02 Mayıs 2023

Soğuk Mührürlüdür

Öncelikle saygı ve selamlarımızı arz ederiz.

İlgi: **943** sayılı ve **18.04.2023** tarihli yazınız.
Biz Özel AL-Bnook Hastanesi / Özel Laboratuvar Departmanı olarak, **MURTADHA KADHIM MALLAKH** isimli öğrencinin, **"GTF GENİNİN MOLEKÜLER SAPTANMASI VE BAKTERİYOSİN ÜRETİMİYLE AĞIZ FLORALARI İLE AĞIZ HASTALIĞINA NEDEN OLAN PATOJENİK BAKTERİLER ARASINDAKİ AYRIMIN İNCELENMESİ"** tez başlığı altında yürüttüğü bilimsel araştırma gereksinimlerini tamamlamak amacıyla fakültenizin Tıbbi Laboratuvar Teknolojileri Bölümü'nde çalışma yapmasında hastanemiz açımızdan herhangi bir sakınca bulunmadığını bilgilerinize arz ederiz.
Saygılarımızla.

Uzman Dr. Cemile Luvis Kazım
Özel Bnook Hastanesi Müdürü
Kaşe ve İmza

Iraq-Baghdad
Albnook, al-Baydhaa district 315, st.23 next to
Petrol station
Albnook, al-Baydhaa district 315, st.23 next to

ANKARA 34. NOTERLİĞİ
İmza Yetkili Memur

İşbu belge tarafımdan ibraz edilen ~~Aslının~~ Fotokopisine sadık kalınarak ~~Türkçe-Arapça~~ çevrilmiştir
~~Yeminli~~ Tercüman Ömer DEDE

İşbu belgenin dairemiz yeminli tercümanı Ömer DEDE tarafından (Türkçe-Arapça) ~~Arapça-Türkçe~~ çevrildiğini onaylarım.

DEDE TERCÜME
Danışmanlık Turizm Dış Ticaret Ltd. Şti.
Telefon: 0312 418 37 67
Cep: 0538 057 78 13
0555 105 55 62
E-mail: dedatercume@gmail.com
V.D No: Çankaya 272 106 1639
Mersis No: 0272106163900001
Sicil No: 475100
Meşrutiyet Mah. Karanfil Sok. Usluhan Apt. Blok No: 16 İç Kapı No: 64 Çankaya/ANKARA

مستشفى البنوك الاهلي
HOSPITALPRIVATEAL-BNOOK

5795

02 Mayis 2023

العدد :- (791)

التاريخ:- 2023/4/25

مستشفى البنوك الاهلي
الذاتية

الى كلية اشور الجامعة

م/ تسهيل مهمة

تحية طيبة :-

اشارة الى كتابكم ذي العدد 943 في 2023/4/18 نود اعلامكم بأنه لامانع لدى مستشفانا (مستشفى البنوك الاهلي / قسم مختبر البنوك الاهلي) من تسهيل مهمه المعيد (مرتضى كاظم ملاخ) في قسم تقنيات المختبرات الطبية في كليتكم لغرض انجاز متطلبات بحثه بعنوان (دراسة التمايز بين الفلورا الفموية والبكتريا المسببة للامراض المسببة لامراض الفم عن طريق الكشف الجزيئي عن جين GTF وانتاج البكتريوسين)

مع التقديـــر

مديرة مستشفى البنوك الاهلي

Iraq-Baghdad
Albnook , al-Baydhaa district 315 , st.23 next to
petrol station
AL-Banook ,AL-Baydhaa district 315 , st.23 next to

ANKARA 34. NOTERLİĞİ
İmza Yetkisi Alınmıştır
Mehmet DOĞRU

DEDE TERCÜME
Danışmanlık Turizm Dış Ticaret Ltd. Şti.
Meşrutiyet Mah.Karaelli Sok.Usluhan Apt.Blok.No: 16 İç Kapı No: 64 Çankaya/ANKARA
Telefon: 0312 418 37 67
Cep: 0538 057 78 13
0555 105 53 62
E-mail:dede.tercume@gmail.com
V.D.No: Çankaya 272 106 1639
Mersis No: 0272106163900001
Sicil No: 875100

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı ve Soyadı : Murtadha Kadhim Mallakh AL-DELIHEIM

Eğitim

Yüksek Lisans	Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı	2021-2023
Lisans	Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2015-2019