جمهورية العراق

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة القادسية/كلية التربية

قسم علوم الحياة

عزل وتشخيص بعض انواع الجراثيم المسببة لتلوث الاسنان

بحث تخرج مقدم إلى

مجلس كلية التربية/جامعة القادسية وهو جزء من متطلبات نيل شهادة البكالوريوس في علوم الحياة

من قبل الطالب

ابراهيم مجيد خلبوص

أشراف

الدكتورة

احلام علي

ابريل / 2019 م **شعبان / 1440هـ**

بسم الله الرحمن الرحيم

(وَقُلْ رَبِّ زِدْنِي عِلْمًا)

سورة طه(114 (

الإهــداء

إلى مصباح الهدى وسفينة النجاة إلى من أنار بدمه دجى الحياة

... الإمام الحسين (عليه السلام)

إلى رمز المحبة وفيض الحنان

... والدي العزيز

إلى من ألهمني العزم وزرع في نفسي الأمل

... والدتي العزيزة

إلى شموع عمري وسندي في الحياة

... أخوتي وأخواتي

أهدي ثمرة جهدي المتواضع

شكر و عرفان

قال رسول الله صلى الله عليه وسلم
"من لم يشكر الناس لم يشكر الله"
صدق رسول الله صلى عليه وسلم
الحمد لله على احسانه والشكر له على توفيقه وامتنانه ونشهد ان لا الله الا الله وحده لا شريك له تعظيما لشانه ونشهد ان سيدنا ونبينا محمد عبده ورسوله الداعي الى رضوانه صلى الله عليه وعلى اله واصحابه واتباعه وسلم
بعد شكر الله سبحانه وتعالى على توفيقه لنا لا تمام هذا البحث المتواضع أتقدم بجزيل الشكر الى الوالدين العزيزين الذين اعانوني وشجعوني على الاستمرار في
مسيرة العلم والنجاح واكمال الدراسة الجامعية والبحث ; كما أتوجه بالشكر الجزيل الى من شرفتني بأشرافها على مذكرة بحثي الدكتورة أحلام علي التي لن تكفي حروف هذه المذكرة لايفائها حقها بصبرها الكبير علي ولتوجيهاتها العلمية التي لا تقدر بثمن والتي ساهمت بشكل كبير
في إتمام واستكمال هذا العمل ; الى كل أساتذة قسم علوم الحياة كما أتوجه بخاص شكري وتقدري
الى كل من ساعدني
من قريب او بعيد على انجاز واتمام هذا العمل
"رب اوزعني ان اشكر نعمتك التي انعمت علي وعلى والدي وان اعمل صالحا ترضاه وادخلني برحمتك في عبادك الصالحين"

الخلاصة:

هدفت الدراسة الحالية إلى دراسة تأثير تواجد بعض الأحياء المجهرية الفموية لعزلات *Streptococcus mutans* و ضراوة هذه الجرثومة المسببة لتسوس الأسنان؛ إذ تم عزل 150 عزلة جرثومية من 121 مسحة من سطوح الأسنان واللثة للمرضى المراجعين من كِلا الجنسين وبأعمارٍ مختلفة للمراكز التخصصية وعيادات الأسنان في مدينة الديوانية بعد أن شُخصوا سريرياً بإخماج الفم (الأسنان واللثة) من قِبل الأطباء المختصين للمدة من 2018/01/1 م ولغاية 2019/3/1 م.

شُخِّصت العزلات الجرثومية بإستخدام الإختبارات الكيموحيوية وصبغة كرام. تصدرت جرثومة المكورات السبحيَّة *Streptococcus* spp. أعلى نسبة بلغت 31.52% تلتها جرثومة المكورات العنقودية *Staphylococcus* spp. بنسبة 20.45% وجرثومة عُصيات الحليب *Lactobacillus* spp. بنسبة 12.52% ثم الخميرة *Candida* spp. بنسبة 10.64%, وتوالت بعدها بعض الجراثيم التي أحرزت نسباً قليلةً مقارنةً بالجراثيم المذكورة, كما أحرزت جرثومة المكورات السبحيَّة الغشائية *S. mutans* من بين الأنواع الجرثومية المعزولة من سطوح الأسنان واللثة أعلى تردداً في عدد العزلات وأُختُبِرت قدرتها جميعها على تكوين الغشاء الحيوي؛

أُختُبِرت الحساسية الدوائية لعزلات *S. mutans* تجاه 11 مضاداً حيوياً بإستخدام طريقة الإنتشار بالأقراص التي أوضحت أنَّ مقاومة العزلات للمضادات الحيوية كانت أعلى من حساسيتها لها بلغت مقاومة العزلات لمضاد الإرثرومايسين (94.64 و 98.21)% والأموكسيسيلين (85.71)% لِكلٍ منهما والأمبيسيلين (80.35 و 83.92)% وحامض الناليدسك (80.35 و 87.50)% والسيفوتاكسيم (69.64 و 75.00)% والكلورامفينيكول (69.64 و 89.28)% والأموكسيسيلين – حامض الكلافيولانك (58.92 و 76.78)% والجنتامايسين (57.14 و 78.57)% والتتراسايكلين (55.35 و 66.07)% لِكلٍ منهما على التوالي, ولِمضادي الأميكاسين (25.00 و 48.21)% والترايميثوبرايم سلفاميثاكسيل (7.14 و 19.64)% لِكلٍ منهما على التوالي.

المقدمة Introduction

تقع جرثومة المكورات السبحيَّة *Streptococcus mutans* ضمن مجموعة الجراثيم الموجبة لصبغة گرام وهي من أبرز الأنواع الجرثومية المكونة للأغشية الحيوية؛ إذ إنها تستوطن الفم خلال الأيام الأولى بعد الولادة وبمرور الوقت تتواجد أنواعاً أخرى مرافقة للسبحيَّات من المجموعتين الموجبة والسالبة لصبغة گرام (Lamont and Jenkinson, 2010).

وخمج ما حول السن وتسوس الأسنان وغيرها (Rogers, 2008; Banas, 2004). ويُعتقد أيضاً أن التداخل ما بين الأنواع الجرثومية المتواجدة في الفم أثناء تكوين الغشاء الحيوي يؤدي إلى التصادم في ميكانيكية التحاور الجرثومي خلال الإشارات التي تطلقها لتكوين الغشاء الحيويإحتلَّ موضوع تسوس الأسنان إهتمام الباحثين والمختصين في مجال طب الأسنان؛ كونهِ يُشكِّل مُشكلة بالغة الصعوبة لذوي الإختصاصات, فضلاً عن تسبُبِهِ بآلامٍ شديدةٍ أكثر من الأمراض المُعدية الأخرى وبقائهِ عاملاً مسؤولاً عن فقدان معظم الأسنان في جميع الأعمار دون غيرهِ من المُسبِبات, ويعود سبب تسوس الأسنان وتقدمهِ إلى مراحل متطورة بشكلٍ رئيس إلى وبائية جرثومتي *S. mutans* والعصيات اللبنية *Lactobacillus* spp. في تجويف الفم, وأن مصدر هذه الجراثيم وغيرها قد يكون داخلياً Endogenous مُتمثلاً بالنبيت الطبيعي Normal flora أو خارجياً Exogenous كما في الجراثيم الملوثة لمينا الأسنان من البيئة المحيطة كالغذاء والماء نتيجةً لعدم العناية بنظافة الأسنان أو الإفتقار للتعقيم أو إنخفاض حساسية الجراثيم المراد تنظيف الأسنان منها بفعل آليات المقاومة التي تمتلكها وبالتالي فأن إزدياد إعداد الجراثيم في التجويف الفمي يكوِّن ما يسمى بالأغشية الحيوية التي تُمثل إرتباط هذه الجراثيم بسطوح المواد الحية وغير الحية، وتُرسب هذه الأغشية على مينا الأسنان يكوِّن ما يُعرف بالصفيحة السنية Dental plaque المؤدية إلى تسوس الأسنان (Rogers, 2008; Donlan, 2002).

تكون سطوح مينا الأسنان صلبة ومؤلفة من ملايين الحزم Prisms يتراوح عـددها ما بين (5 – 12) مليون حزمة متكونة أساساً من أنواع مختلفة من المعادن منها أملاح فوسفات الكالسيوم, ومن ناحية التركيب الكيميائي للسن تمثل المينا مادة عالية المحتوى من البلورات المعدنية وتركيبها يحتوي على (95 – 98)% من وزنها مواداً غير عضوية تسمى Hydroxy apitite يكون أغلب محتواها معدني أما مكوناتها الأخرى فهي مواد عضوية تُشكِّل (1 – 2)% من وزنها, أما محتواها

المـــــــائي فهو قلـــــيل لا يتجـــاوز 4% من وزنـــــها (Burnett and Scherp, 1995; Brauer and Richardson, 1964). كما أن اللعاب له أهمية في حماية الفرد من إصابات الأحياء المجهرية لإمتلاكه بروتينات مختلفة لها آليات حماية مثل الميوسين Mucin والإنزيمات الحالة Lysonzyme (Marsh, 2006).

والخصائص الفسلجية للكائنات المكونة لهُ إضافةً إلى إمتلاكها مورثات مقاومة؛ لذلك كان لابد من دراسة عوامل الضراوة لهذه الجراثيم من الناحية الوراثية الأمر الذي يؤدي إلى الإقتراب من تقليل تأثير هذه الجراثيم على أسنان الإنسان (Ryder, 2005).

أشارت دراساتٍ عِدَّة إلى دور المعُزز الحيوي Probiotic في التقليل من التسوس والقدرة على تثبيط نمو الجراثيم التي تعد مسببات رئيسة لهذا المرض، ومنها المعزز الحيوي المحضر من جرثومة حامض اللاكتيك *Lactobacillus* spp. في تقليل إلتصاق جرثومة *S. mutans* باللعاب المغطي لمادة Hydroxyl apatite بشكل خرز (Comelli *et al*., 2002). ونظراً للدور الكبير الذي تلعبه عملية الإلتصاق في إحداث الإمراضية وبقاء الجراثيم وإكتسابها مقاومة لكثيرٍ من المواد ومنها المضادات الحيوية؛ برزَ إتجاه جديد للسيطرة على إنتشار الجراثيم وتكاثرها وذلك بتثبيط أو إعاقة عملية الإلتصاق بإستعمال جراثيم تُعطى بكميات محدودة تضيف فائدة صحية للمضيف وهي ما تعرف بالمُعززات الحيوية (Ogawa *et al*., 2011).

هدف الدراسة Aim of study

1- عزل الجراثيم المُسببة لحالات تسوس الأسنان وتشخيصها بالطرق الروتينية وتوكيد تشخيص جرثومة *S. mutans*.

2- إختبار الحساسية الدوائية لجرثومة *S. mutans* تجاه عدد من المضادات الحيوية قبل وبعد تكوين الغشاء الحيوي.

المواد وطرق العمل

جمع العينات Collection of samples

جُمِعت 121 عزلة جرثومية من سطوح الأسنان واللثة للمرضى المصابين بإلتهاب اللثة والأسنان الذين راجعوا المراكز التخصصية وعيادات الأسنان في مدينة الديوانية ومن كِلا الجنسين وبأعمارٍ مختلفةٍ لمدة أربعة أشهر إمتدت من (2018/10/1 م) حتى (2019/3/1م)؛ إذ أُخذت المسحات بإشراف الطبيب المختص وإستُخدمت المسحات القطنية الحاوية على وسط ناقل (Transport media swabs) في عملية جمع العينات لضمان حيوية العزلات.

العزل والتشخيص الجرثومي Bacterial isolation and identification

العزل Isolation

زُرعت عينات المسحات القطنية Swabs المأخوذة من منطقة تسوس الأسنان بعد أن تم حضنها بدرجة حرارة 37°م لمدة 24 ساعة لغرض تنشيط الجرثومة بطريقة التخطيط على الأوساط الزرعية الإغنائية كوسط أكَار الدم والماكونكي والريكوزا بطريقتي الزرع الهوائي واللاهوائي, وحُضنت الأطباق لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37°م وبعد إكتمال عملية الحضن أُجريت الفحوصات المظهرية والكيموحيوية.

التشخيص Identification

أ- الخصائص المظهرية Morphological Characteristics المتضمنة دراسة الخصائص المظهرية للمستعمرات بما فيها الشكل والحجم والإرتفاع والقوام والقطر وغيرها.

ب- الإختبارات الكيموحيوية Biochemical tests المتضمنة:

1- إختبار الكتاليز Catalase test: نُقلَ جزء من مستعمرة فتيَّه بعمر 24 ساعة بوساطة ناقل زرعي إلى شريحة زجاجية نظيفة ومن ثم أُضيفت قطرة من محلول بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 بتركيز 30%. وتكون النتيجة موجبة بظهور فقاعات من غـــاز الأوكســجين (Macfaddin, 2000).

2- إختبار الأوكسيديز Oxidase test: نُقلَ جزء من مستعمرة فتيَّه بعمر 24 ساعة بوساطة عود خشبي مُعقم إلى ورقة ترشيح مشبَّعة بكاشف الأوكسيديز, وأنَّ تكوّن اللون الأزرق خلال 10 ثوانٍ دليل على إيجابية الإختبار (Macfaddin, 2000).

3- إختبار إنتاج إنزيم مخثر البلازما Coagulase test: تم التحري عن إنتاج إنزيم مخثر البلازما بالإعتماد على طريقة أنبوبة الإختبار (Test tube)، حيث تم إضافة 0.5 مل من بلازما دم الإنسان غير المخفف إلى أنابيب إختبار حاوية على 0.5 مل من وسط تربتون الصويا السائل والملقحة بالمستعمرات البكتيرية المراد إختبارها. حُضِنت أنابيب الإختبار في حمام مائي بدرجة حرارة 37°م لمدة أربع ساعات تم خلالها مراقبة تكوّن الخثرة, لكونها دليلاً على إيجابية الفحص. أما الأنابيب التي لم تُظهِر إستجابة للإختبار تُركت في الحاضنة مدة 24 ساعة وبدرجة حرارة 35°م للتأكد من النتائج (Macfaddin, 2000).

4- إختبار اليوريز Urease test: لُقِحت الأنابيب الحاوية على مائل وسط اليوريا بالمزروع الجرثومي وحُضِنت الأنابيب بدرجة حرارة 37°م لمدة (1 – 7) أيام, ويُعد تغير لون الوسط من الأصفر إلى الوردي كنتيجة إيجابية للإختبار (Macfaddin, 2000).

5- إختبار إختزال النترات Nitrate reduction test: لُقِحت الأنابيب الحاوية على وسط النترات السائل وحُضِنت لمدة 96 ساعة بدرجة حرارة 37°م وبعدها أُضيف 0.1 مل من الكاشف, ويعد ظهور اللون الأحمر خلال 30 ثانية دليل على إختزال النترات (Collee *et al*., 1996).

6- إختبار تحلل الدم Heamolysis test: لُقحت أطباق وسط أكار الدم Blood aagar بالجرثومة المراد إختبارها وبطريقة التخطيط وحُضنت بدرجة حرارة 37°م لمدة (18 – 24) ساعة, ولوحظت النتيجة الموجبة عند حدوث تحلل دموي حول المستعمرة النامية دلالةً على أنه من نوع ß-heamolytic وفي حالة ظهور لون أخضر حول المستعمرة فأن التحلل من نوع α-heamolytic, أما في حالة عدم حصول التحلل فأنه من نوع γ-heamolytic (Macfaddin, 2000).

7- إختبار الحركة Motility test: لُقِحت الأنابيب الحاوية على وسط الحركة بطريقة الطعن وحُضِنت لمدة 48 ساعة, ولوحظت النتيجة الموجبة بإنتشار النمو خارج حدود الطعنة بينما لوحظت النتيجة السالبة بنمو الجراثيم في منطقة الطعن فقط وبقاء الوسط المحيط صافياً (Macfaddin, 2000).

8- مجموعة إختبارات IMVC المُكوّنة من:

- إختبار إنتاج الأندول Indol production test: إستُخدم في هذا الإختبار وسط ماء الببتون (Peptone water) الذي لُقِحَ بجزء من المستعمرة البكتيرية النقية المراد إختبارها، ثم حُضنَ الوسط بدرجة حرارة 37°م لمدة 24 ساعة بعد ذلك أُضيفت عدة قطرات من كاشف كوفاكس Kovac's reagent إلى الوسط. وأنَّ ظهور حلقة حمراء اللون دليل على إيجابية الفحص وقدرة الجرثومة على تحليل الحامض الأميني التربتوفان Tryptophan وإنتاج الأندول (Baron and Finegold, 1995).

- إختبار أحمر المثيل Methyl red test: إستُخدم في هذا الإختبار وسط ماء الببتون, الكلوكوز والفوسفات, حيث يوضَّح قابلية الجرثومة على تخمير سكر الكلوكوز وإنتاج الحامض العضوي الذي يؤدي إلى خفض الأس الهيدروجيني للوسط إلى أقل من 4.5, ولُقِحت الأنابيب الحاوية على الوسط بجزء من المستعمرة الجرثومية النقية المراد إختبارها وحُضِنت بدرجة حرارة 37°م لمدة 48 ساعة. بعد إنتهاء فترة الحضن أُضيفت 5 قطرات من كاشف المثيل الأحمر وسُجِلت النتيجة الموجبة بظهور اللون الأحمر دلالةً على إنتاج الحامض، في حين أنَّ بقاء اللون الأصفر يمثل النتيجة السالبة (Collee *et al*., 1996).

- إختبار فوكس – بروسكاور Voges – Proskauer test: لقح وسط ماء الببتون, الكلوكوز والفوسفات بجزء من المستعمرة البكتيرية النقية المراد إختبارها ثم حُضِن بدرجة حرارة 37°م لمدة (24 – 48) ساعة, بعد ذلك أُضيف كاشف باريت Barrit reagent المتضمن 1مل من محلول هيدروكسيد البوتاسيوم KOH بتركيز 40% و 3مل من محلول α –Naphthol بتركيز 5% إلى الوسط مع التحريك الهادئ ثم تُرك ساكناً لمدة (10 – 15) دقيقة، وإستدلَ على النتيجة الموجبة بظهور اللون الأحمر دلالةً على تكوّن المركب المتعادل (Acetyl methyl carbinol) والذي يختزِل بدوره مركب Diacetyl carbinol (Turnidge and Grayson, 1993).

- إختبار إستهلاك السترات Citrate utilization test: لُقِحَ في هذا الإختبار وسط سيمون ستريت بجزء من المستعمرة البكتيرية النقية المراد إختبارها وحُضِنَ بدرجة حرارة 37°م لمدة (24 – 48) ساعة, وإستدلَ على إيجابية الفحص بتغير لون الوسط من الأخضر إلى الأزرق دلالةً على إستهلاك الجرثومة للسترات على أنهُ مصدرٌ وحيدٌ للكاربون, فضلاً عن إنتاج عدد من المركبات القاعدية في الوسط المؤدية إلى رفع الأس الهيدروجيني نحو القاعدية (Winn *et al.*, 2006).

تشخيص عزلات خميرة المبيضات Identification of Candida

زرِعت المسحات القطنية المأخوذة من أفراد سليمين وغير مصابين بالتسوس بطريقة التخطيط على وسط S.D.A. ثم نُقلت بوساطة الناقل (Loop) للحصول على مستعمرات نقية لكل عزلة ثم حُضِنت الأطباق بدرجة حرارة 37°م لمدة (24 – 48) ساعة. شُخِصَ جنس المبيضات والأنواع التابعة له إعتماداً على ما جاء في Ellis وجماعته (2007) والذي إشتمل على:

1- الصفات الزرعية والفحص المجهري لعزلات خميرة المبيضات: شُخصت العزلات مبدئياً إعتماداً على نموها على وسط أكار السابرويد ولوحظ شكل ولون وقوام وإرتفاع المستعمرة على هذا الوسط الزرعي وحُضِّرت شريحة زرعية من المستعمرات النامية بعضها بصبغة كرام؛ إذ تأخذ الخميرة لون الصبغة. كما شُخِّصت بواسطة وسط أكار الكروم التفريقي لأنواع المبيضات والمُحضَّر من مزج 47 غم من الوسط مع لتر من الماء المقطر ثُمَّ تُرِكَ ليتصلب حتى زُرِعت عليه الخمائر بطريقة التخطيط.

حفظ وإدامة العزلات الجرثومية

1- الحفظ قصير الأمد Short term storage: أُديمت العزلات الجرثومية لأسابيعٍ قليلة على وسط أكار الماكونكي. صُبَّ الوسط الزرعي بشكلٍ مائل (Slant) ولُقِحت الأطباق ثم لُفت جيداً بشريط بارافيلم (Parafilm) وحُفظِت بدرجة حرارة 4°م (Mainiatis *et al.*, 1982).

2- الحفظ طويل الأمد Long term storge: إستُخدِمَ وسط نقيع الدماغ والقلب بإضافة الكليسرين بتركيز 20% ووزع الوسط في قناني صغيرة محكمة الغلق وبحجم 10 مل لكل قنينة ثم عُقِمت بالموصدة ولُقحت بعدها بنسبة 0.01 مل من مزارع جرثومة *S. mutans* ثم حُضِنت بدرجة حرارة 37°م لمدة 24 ساعة وحفظت بعدها بدرجة -20°م (Lewis *et al.*, 2001). إستُخدمت هذه الطريقة لحفظ

المزارع الجرثومية لمدة طويلة تصل إلى ثلاثة أشهر. أما جرثومة *Lactobacillus acidophillus* فأستُخدم لها وسط .M.R.S السائل وبنفس عملية حفظ جرثومة .*Sterptococcus* spp.

التحري عن الحساسية الدوائية لعزلات *S. mutans* تجاه عدداً من المضادات الحيوية

تمت زراعة جرثومة *S. mutans* في وسط تربتون الصويا لقياس حساسيتها للمضادات الحيوية قبل تكوين الأغشية الحيوية ثم تمَّ تنميتها على وسط (.T.S.B) الحاوي على 1% من الكلوكوز لفحص حساسيتها للمضادات الحيوية بعد تكوين الأغشية الحيوية. وتضمَّنَ إختبار الحساسية الدوائية للعزلات الجرثومية بطريقة الأقراص بالإعتماد على طريقة NCCLS (2003) في الخطوات التالية:

1- غُمِّست المسحة القطنية في مرق تربتون الصويا المزروع وأُزيل الفائض منها بضغطها على الجوانب الداخلية للأنبوبة.

2- نُشِرت الجراثيم على وسط مولر- هنتون الصلب بطريقة التخطيط لأكثر من مرتين وبإتجاهات مُختلفة لغرض التأكُد من نشر الجراثيم المراد إختبار حساسيتها بالتساوي، وتُركت الأطباق لمدة 15 دقيقة في درجة حرارة الغرفة لضمان إمتصاص الرطوبة.

3- وُضعت أقراص المضادات الحيوية بواقع خمسة أقراص في طبق قياسهُ 100 ملم و 12 قرصاً في طبق قياسهُ 150 ملم، والمسافة بين كل قرص وآخر 24 ملم (من مركز القرص الأول إلى مركز القرص الآخر).

4- حُضِنت الأطباق بدرجة حرارة 35°م لمدة (16 – 18) ساعة لجميع أنواع المضادات الحيوية، ثُم قي

النتائج والمناقشة Results and Discussion

عزل وتشخيص الجراثيم المتوطِّنة في الفم

جُمِعَت 121 مُسحة من الأشخاص المصابين بتسوس الأسنان وحُصِلَ منها على 150 عزلة شُخِصت على أنها جراثيم موجبة وسالبة لصبغة گرام) إذ أظهرت النتائج سيادة المكورات السبحيَّة .*Streptococcus* spp بتسجيلها أعلى نسبة مئوية بلغت 31.52% من مجموع نسب الجراثيم المعزولة من مناطق تسوس الأسنان تلتها المكورات العنقودية .*Staphylococcus* spp بنسبة 20.45% ثمَّ عُصيات الحليب .*Lactobacillus* spp بنسبة 12.52%. كما سجلت جرثومة الخميرة .*Candida* spp نسبة عزل بلغت 10.64% وجرثومة الزائفة الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa*

نســــبة 5.21% في حين إحتلت الجـــراثيم (*Enterobacter* spp. و *Enterococcus* spp. و *Micrococcus feacalis* و *Corynbacterium* spp. و *Neisseria* spp. و *Shigella* spp. و *Escherichia coli* و *Proteus* spp. و *Klebsiella oxytoca*) النِسب المئوية الأقل في تواجدها في مناطق تسوس الأسنان

كما يلاحظ أن الجراثيم العائدة لجنس المــكورات السبحية *Streptococcus* spp. تُظهِر تفوّق جـــرثومة *S. mutans* على باقي أنواع المكورات السبحيَّة المعزولة من مناطق تسوس الأســـنان بتسجيلها أعلى نسبة مئوية بلغت 37.09%, بينما جـــاءت جـــرثومـة *S. sangius* في المـــرتبـــة الثانيـــة بنسبة 12.58% تلتها كُـــلٌ من جـــرثومة *S. mitis* و *S. intermedius* و *S. oralis* بنسبة 10.59% و 9.27% (و 7.28%), على التوالي. كــما ظهرت جرثومـة *S. salivarius* بنسبة 6.62% و *S. pneumoniae* بنسبة 5.96%), أما أقل نسبة عزل فكانت من نصيب جرثومتي *S. pyogens* و *S. sorbinus* اللتان بلغت نسبة عزل كُلٌ منهما 4.63% (و 3.97%, على التوالي.

جدول (1): الجراثيم المعزولة من الفم ونسبها المئوية.

ت	الجراثيم المعزولة من الفم	عدد العزلات	%	أنواعها	عدد العزلات	%
1	*Streptococcus* spp.	30	31.52	*S. mutans*	9	37.09
				S. sanguis	6	12.58
				S. mitis	5	10.60
				S. intermedius	3	9.27
				S. oralis	3	9.27
				S. salivarius	2	6.62
				S. pneumonia	1	5.96
				S. pyogenes	1	5.96
2	*Staphylococcus* spp.	19	20.45	*Staph. Epidermidis*	73	74.49
				Staph. Aureus	25	25.51
3	*Lactobacillus* spp.	12	12.52	*L. acidophilus*	43	71.66
				L. casei	17	28.33
5	*Candida* spp.	11	10.64	*C. albicans*	31	60.78
				C. tropicalis	12	23.52
				C. glabrata	8	15.68
6	*Pseudomonas aeruginosa*	9	5.21	—		
7	*Enterobacter* spp.	8	4.17	—		
8	*Enterococcus* spp.	7	3.34	—		
9	*Micrococcus feacalis*	5	2.92	—		
10	*Corynbacterium* spp.	5	2.9 0	—		
11	*Neisseria* spp.	4	2.08	—		
12	*Shigella* spp.	4	2.07	—		
13	*Escherichia coli*	3	1.25	—		
14	*Proteus* spp.	3	1.25	—		

15	*Klebsiella oxytoca*	1	0.83	—
العدد الكلي للعزلات			121	

ويوضّح الجدول أيضاً أنَّ جرثومة *Staph. epidermidis* التابعة لجنس المكورات العنقودية *Staphylococcus* spp. أعطت أعلى نسبة مئوية بلغت 74.49% عند عزلها من مناطق تسوس الأسنان مقارنةً بجرثومة *Staph. aureus* البالغة نسبتها 25.51%

أما جرثومة *L. acidophilus* التابعة لجنس عُصيات الحليب *Lactobacillus* spp. فبلغت نسبتها المئوية 71.66% متفوقةً على جرثومة *L. casei* التابعة للجنس نفسه والبالغة نسبتها 28.33% كما أظهرت الأنواع التابعة لخميرة المبيضات *Candida* spp. تفاوتاً في نسبة إصابتها, إذ تفوَّق النوع *C. albicans* بإحرازهِ أعلى نسبة مئوية بلغت 60.78% مقارنةً بكِلا النوعين *C. tropicalis* بنسبة 23.52% و *C. glabrata* بنسبة 15.68% على التوالي.

إنَّ سيادة جراثيم المكورات السبحية على بقية الجراثيم المعزولة في الدراسة الحالية تتفق مع نتائج Simon (2007) كونها المسبب الرئيس لآفات التسوس (Caries lesions). كما أنَّ سيادة النوع *S. mutans* على باقي الأنواع الأخرى يتفق مع ما وجدهُ الزبيدي (2010) من سيادة لجرثومة *S. mutans* على باقي الجراثيم المسببة لتسوس الأسنان. كما أن ظهور جراثيم المكورات العنقودية وخاصةً النوع *Staph. epidermidis* في محيط الفم يتفق مع ما وجدتهُ الموسوي (2006) من أن سبب إنتشار هذه الجراثيم في محيط الفم قد يعود إلى كونها من الممرضات المهمة ذات القدرة على إحداث الأمراض الإنتهازية (Opportunistic infections) بسبب تواجدها الطبيعي على أجسام الحاملين (Carrier) على الجلد وفي أعلى الأنف والقناة الهضمية والتناسلية (Landman, 2001). أو بسبب إمتلاكها للعديد من المستضدات السطحية والإنزيمات التي تساعدها في عملية إختراق أنسجة الجسم (Fong, 2002).

وفيما يخص عصيات الحليب المحبة للحموضة *L. acidophilus* فأن نتائج عزلها جاءت متوافقة مع نتائج الحسيني (2002) في نسبة العزل. وأن سيادة خميرة المبيضات في الفم على باقي أنواع الخمائر الأخرى تتفق مع الموسوي (2006) إذ أن الإصابات الفطرية في المرضى الضعاف مناعياً تتضمن خميرة المبيضات دائماً؛ ذلك لإمكانيتها من إظهار قابليتها الإمراضية كممرضات حقيقية في بعض الظروف

كإنتاجها لإنزيمات Proteinase و Uronidase و Collaginase و Neuroaminidase التي تساعدها في إختراق إنسجة وخلايا المضيف وإحداث الإمراضية (Rouabhia and Chmielewski, 2012).

كما أن إختلاف نسب العزل للأنواع التابعة للعائلة المعوية (السالبة لصبغة گرام) يعود إلى ندرة وجودها في محيط الفم, وهذا ما أكدتهُ دراسات كل من Waltimo وجماعتهِ (1997) والموسوي (2006) والزبيدي (2010) من أن معظم الجراثيم السالبة لصبغة گرام تأتي من إلتهابات الجهاز التنفسي أو من القناة المعدية – المعوية وتظهر في الفم. وأوضحَ AL–Aswad (1999) أنَّ الإختلاف في نسب العزل يتغير تبعاً لتغير الإصابة, ووجد Sulaiman (2000) أن نسب عزل الجراثيم تزداد بإزدياد أعداد الأسنان المسوَّسة. كما يُعتقد أن لنوعية الوسط الزرعي المستعمل وطريقة العزل وعوامل أخرى غير معروفة تأثيراً كبيراً في إختلاف نسب العزل للجراثيم, إضافة إلى أن الإختلاف في مستوى الوعي الصحي والعناية المستمرة بتنظيف الأسنان وثقافة المجتمع لها تأثيراً كبيراً على ذلك.

تأثير بعض الجراثيم على عملية تكوين الغشاء الحيوي بوساطة جرثومة *S. mutans*

يُظهِر الشكل (4 – 2) أنَّ الزرع المختلط لجرثومة *S. mutans* مع الجراثيم الأخرى قلَّلَ من نسبة تكوينها للغشاء الحيوي الذي كوَّنتهُ بنسبة 61.00%؛ إذ بلغت نسبة تكوين الغشاء الحيوي للزرع المختلط بوجود *S. oralis* مع *S. mutans* 6.00% والزرع المختلط لـ *S. salivarius* مع *S. mutans* 8.25% في حين قلَّلت جرثومة *L. acidophilus* في الزرع المختلط مع *S. mutans* من تكوينها للغشاء الحيوي إلى نسبة 5.50%. كما قلَّلَ الزرع المختلط لجرثومة *C. albicans* مع *S. mutans* تكوين الغشاء الحيوي إلى 7.50%. مما يُشير إلى فاعلية الجراثيم المستخدمة في الزرع المختلط مع جرثومة *S. mutans* والتي أدت إلى تقليل عملية تكوين الغشاء الحيوي بنسبة عالية مقارنةً بتكوينه في الزرع المفرد.

مِنَ الملاحظ أن الزرع المختلط لجرثومة *S. mutans* مع *L. acidophilus* (شكل 4 – 2) قلَّلّ من تكوينها للغشاء الحيوي إلى أدنى نسبة (5.50%) مقارنةً بالأنواع الأخرى, ويتفق ذلك مع نتائج Oshsner (2006) والزبيدي (2010). ويعود هذا التأثير إلى إفراز جرثومة *L. acidophilus* مواداً

مثل Lactocidin و Plantracin و Acidophilin تعمل على تنظيف مناطق حواف الأســـنان وبالتالي تمنع إلتصاق العديد من الخـــلايا الجـــرثومية بمستقبلاتهـــا (Gibson and Roberfroid, 2008; Gaon *et al*., 2002). كما ذكرَ Simark–Mattsson وجماعته (2007) بأن تغطية سلالات جرثومة حامض اللاكتيك مسبقاً لحواف الأسنان تقلل من إرتباط جراثيم المكورات السبحيَّة, وأن تحرر غاز CO_2 أثناء عملية التخمر له تأثيراً تثبيطياً تجاه الأنواع المختلفة؛ بسبب حدوث تثبيط للجراثيم المتعايشة معها من خلال تخليقها لظروفٍ لاهوائية تُعيق نمو الكائنات المجبرة هوائياً أو تأثيرها على الأس الهيدروجيني للخلايا (Adams and Nicloaides, 1997).

كما أنَّ توافر سكر اللاكتوز في الحليب يعمل على التقليل من عدد الجراثيم؛ كونهِ مختلفاً عن سكر الكلوكوز الذي يُسهِّل إلتصاق الجراثيم على سطوح الأسنان (حامد, 2001). وأشارَ Shrestha وجماعته (1994) إلى أن البروتينات التي تفرزها جـــرثومة *L. acidophilus* تُمتص على سطوح الأسنان وبالتالي تمنع ذوبان مينا الأســـنان وتقلل من تـــوافر السطـــوح المـــلائمة لنمـــو *S. mutans*. وهذه النتـــائج جـــاءت متفقـــة مع Ogawa (2011) الذي وجـــدَ عند زرع جـــــرثومة *S. salivarius* مع *S. mutans* فـــأن الأولى تـــؤدي إلى تثبيـــط تكوين الغشاء الحيوي بإفرازها الإنزيم المُحلِّل لليوريا (Urease) المؤثر على التوازن ما بين المجتمعات المتواجدة في الفم, وذكرَ أيضاً بأن جرثومة *S. salivarius* من مميزاتها بأنها غير ملتصقة وتنتج مادة الإنوسين (Enocin) التي تعمل على تثبيط المكورات السبحية من مجموعة المحللة للدم من نوع ألفا.

إنَّ التنافس على المواد الغذائية (Competition of nutrients) يعد أحد الآليات التي تُقلِّل من إحتمالية تكوين الأغشـــية الحيوية حيث أنهُ من الممكن أن تقوم جرثومة *S. oralis* بإستهلاك مواد معينة كالسكريات التي تستهلكها جرثومة *S. mutans* (Wen *et al*., 2010).

تأثير الكربوهيدرات على عزلات *S. mutans* المكوِّنة للأغشية الحيوية

يُبيِّن الشكل (4 – 3) أنَّ نسبة 35.71% (20 عزلة) من عزلات *S. mutans* (56 عزلة) كوَّنت الغشاء الحيوي بوجود السكروز Sucrose في الوسط, في حين بلغت نسبة العزلات المكوِّنة للغشاء الحيوي بوجود الكلوكوز Glucose والفركتوز Fructose معاً في الوسط 25.00% (14 عزلة). كما نلاحظ أنَّ

16.07% (9 عزلات) من العزلات كوَّنت الغشاء الحيوي بوجود الكلوكوز و 12.50% بوجود الفركتوز, بينما بلغت نسبة العزلات المكوِّنة للغشاء الحيوي بغياب السكريات Non sugar في الوسط 10.71% (. وجاءت نتائجنا متطابقة مع نتائج Tahmourespour وجماعته (2010) ومتوافقة مع نتائج Leme وجماعتهِ (2006).

إنَّ قابلية الجراثيم على تكوين الأغشية الحيوية وخاصةً *S. mutans* تزداد بوجود السكريات وخاصةً السكروز والكلوكوز (Caglar *et al.*, 2005) التي تساعدها على الإلتصاق على سطوح الأسنان من خلال آلية إفراز الإنزيمات خارج خلوية ((GTFs) Glucosyltransferases و Fructosyltransferases (FTFs) والكلوكان المرتبط بالبروتينات (Glucan-binding proteins (GBPs)), كل هذه العوامل تُثبت الدور المرضي لجرثومة *S. mutans*, كما أن الكلوكان الذائب في الماء الذي تنتجه جرثومة *S. mutans* يمكن أن يتواجد عندما يقل تركيز الكالسيوم والفوسفات في اللعاب والذي هو سبباً آخر لبداية تنخر الأسنان وتكوين الأغشية الحيوية (Shemesh *et al.*, 2007)

مقاومة العزلات للمضادات الحيوية :-

أُجري إختبار الحساسية الدوائية لجميع عزلات *S. mutans* الواردة في الدراسة والمُسببة لتسوس الأسنان (كونها المسبب الأول والأكثر تردداً وشيوعاً) إتجاه مجموعة من المضادات الحيوية ومقاومتها لها من خلال قياس قطر منطقة تثبيط النمو حول أقراص المضادات استخدمة ومقارنتها بما و يُبيِّن الشكل (4 – 8) أنَّ جميع عزلات *S. mutans* المُسبِبة لتسوس الأسنان قاومت مضاد الإرثرومايسين (Erythromycin) قبل وبعد تكوين الغشاء الحيوي بنسبة 94.64% و 98.21% على التوالي والأموكسيسيلين (Amoxicillin) بنسبة 85.71% قبل وبعد التكوين على التوالي, كما قاومت مضاد الأمبيسيلين (Ampicillin) وحامض الناليديسك (Nalidixicرد في CLSI (2013).

(Gentamicin) والتتراسايكلين (Tetracycline) بنسبة (69.64 و 69.64 و 58.92 و 57.14 و 55.35)% قبل تكوين الغشاء الحيوي, على التوالي وبنسبة (75.00 و 89.28 و 76.78 و 78.57 و 66.07)% بعد تكوين الغشاء الحيوي, بالترتيب. في حين أظهرت العزلات ذاتها مقاومة ضعيفة وحساسية

عالية تجاه مضادي الأميكاسين (Amikacin) والترايميثوبرايم سلفاميثاكسيل (Trimethoprim sulfamethaxale) بنسبة (25.00 و 7.14)% قبل تكوين الغشاء الحيوي و (48.21 و 19.64)% بعد التكوين, على التوالي.

للمضادات الحيوية حتى وأن كانت بتراكيز عالية ذات تأثير قاتل فأن تلك الجراثيم تمتلك خصائص مظهرية مغايرة لبقية الجراثيم الأخرى المكونة للطبقة العليا من الغشاء الحيوي مُكتسِبة بذلك مقاومة عالية للمضادات الحيوية ومُعوضة التالف من الجراثيم التي تم القضاء عليها بجراثيم أخرى أعلى مقاومةً وضراوةً (Keren *et al.*, 2004).

إنَّ من الشائع مقاومة جرثومة *S. mutans* لمركبات الماكروليدات (Macrolides) التي من ضمنها الإرثرومايسين؛ إذ تنشأ المقاومة من خلال إنتاج إنزيم RNA methylase المُشفَّر بوساطة مورثة *erm* (Jorgensen *et al.*, 2004), وأُدرِجَ الإرثرومايسين ضمن قائمة المضادات الحيوية التي تُجابه بمقاومة عالية من قِبل جرثومة *S. mutans* حيث وصلت نسبة المقاومة في بعض السلالات إلى 100% (Leclercq and Courvalin, 1999). وهي مُقاربة من نسبة المقاومة لمركبات الماكروليدات في الدراسة الحالية.

كما أنَّ التباين الملحوظ الذي أظهرتهُ عزلات *S. mutans* في مقاومتها للمضادات الحيوية المُستخدمة قد يعود سببهُ إلى التنوع في آليات المقاومة من خلال إنتاج إنزيمات البيتالاكتام المُثبطة لهذه المضادات أو من خلال تغيير مواقع إرتباط البروتينات الرابطة للبنسلين Penicillin binding proteins (PBPs) (Hiramatsu *et al.*, 2001). والسبب الآخر يعتمد على عوامل الضراوة للجرثومة ذاتها؛ إذ تُظهر بعض العُزلات مُقداراً من المقاومة أكثر من غيرها وأنَّ الإختلاف في ظروف الإختبارات ونوع التقنيات المُستخدمة في الدراسة كُل ذلك مُجتمعاً يُوجد إختلافاً في مستويات المقاومة (Brown *et al.*, 2005).

وأكَّدَ Fuda وجماعته (2004) بأنَّ المقاومة لمركبات البنسلين (Penicillins) لا تشمل فقط إنتاج إنزيم البنسلين وإنزيمات البيتالاكتام بل يتعدى ذلك إلى إنتاج البروتينات الرابطة للبنسلين (PBPs) الواقعة في الغشاء السايتوبلازمي المرتبط بجدار الخلية, وتمتلك هذه البروتينات فعالية إنزيمية مثل Transpeptidases و Carboxypeptidases؛ إذ تُعد هذه البروتينات هدفاً لكلٍ من المضادات الحيوية (البنسلينات والسيفالوسبورينات) تعمل على تغيير الهدف لمضادات البيتالاكتام وبالتالي تنتُج المقاومة الجرثومية لتلك

المضادات, وإنَّ معظم المقاومة التي تُبديها سـلالات *S. mutans* تكون ذات منشأ بلازميدي؛ لِما للبلازميدات من دور في إنتاج إنزيمات البيتالاكتام ومسؤوليتها عن تشفير بعض البروتينات الرابطة للبنسلين (PBPs) (Fuda *et al*., 2006).

إنَّ مقاومة عزلاتنا لمضاد حامض الناليديسك تحدث بعد التعرض لـهُ من خلال طفرات كروموسومية تؤدي إلى تغيير في موقع الهدف المتمثل بإنزيم DNA gyrase الذي يعمل على إلتفاف شريط ألـ DNA (Poirel *et al*., 2006). كما أن سبب مقـاومـة مضـاد الكلورامفينيكول نـاتج عن تحطيم الـدواء من قِبل عـزلات *S. mutans* بوساطة إنزيم Chloramphenicol acetyl transferase (Booth *et al*., 2001). وآلـية مقـاومة مضـاد Amoxicillin – Clavulanic acid الذي هو من المضادات ذات التأثير التعاضدي والمُتميز بمقاومتهِ لإنزيمات البيتالاكتام لا تختلف عن آليات مقاومة المضادات الأخرى من خلال تغيير موقع الهدف لمضادات البيتالاكتام أو من خـلال خفض نفـاذية المضاد الحيوي عِبرَ غشـاء الخلية الجـرثومية (Ryan and Ray, 2004).

أما سبب المقاومة التي أبدها العزلات الجرثومية إتجاه مضادي الجنتامايسين والتتراسايكلين فيُعزى إلى إستعمالهِ موضعياً أو إلى حدوث طفرة أثَّرت في نضوحية الغشاء الخارجي لهذا المضاد (Booth *et al*., 2001).

وفيما يخص مضادَّي ألـ Amikacin و sulfamethaxale Trimethoprim فأن المقاومة الضعيفة والحساسية العالية التي أبدتها عزلاتنا لها يُمكِننا من إعتبار هذين المضادين من المضادات الحيوية ذات التأثيرات العلاجية المتوسطة؛ إذ يُمكن الإستفادة من هذه التأثيرات في علاج الأخماج الناتجة عن جرثومة *S. mutans* المُقاومة للعديد من المضادات الحيوية المختلست أقطار التثبيط و **المصادر**

References

المصادر العربية:

الزبيـــدي, أســـامة فيصـــل كـــوكز (2010). تـأثير المعـزز الحيـوي (Probiotic) المُحضَّـر مـن بكتريـا *Lactobacillus acidophilus* علـى إلتصـاقية البكتريا المعزولـة من تسوس الأسنان. رسالة ماجستير. كلية العلوم. جامعة القادسية. العراق.

العاملي, محمد بن الحسن الحر (1964). وسائل الشيعة إلى تحصيل مسائل الشريعة. ج: 16. ص: 394. مطبعة دار إحياء التراث العربي. بيروت. (مقتبس من حسن, 2005).

الموسوي، علياء موسى علي (2006). عزل وتشخيص بعض البكتريا والخمائر المرافقة لبعض أمراض الفم في مدينة الناصرية وإختبار حساسيتها الدوائية. رسالة ماجستير. كلية التربية. جامعة ذي قار. العراق.

المصادر الأجنبية:

AL – Aswad, J. D. (1999). Prevalence and microbiology of oral mucosal lesion in a sample of complete denture wearers. M. SC. Thesis in Oral Medicine, College for Dentistry – Univ. Baghdad. Iraq.

Albandar, (1999). Periodontal (Gum) disease. J. Periodontology North Jersey area (Nutty New York). 173 – 661 – 2992.

Allison, D. (2000). Community Structure and Co – Operation in Biofilms. 1st ed. Cambridge: Cambridge Univ. UK.

Apolonio, A. C. M.; Carvalho, M. A. R.; Ribas, R. N. R.; Sousa-Gaia, L. G.; Santos, K. V.; Lana, M. A.; Nicoli, J. R. and Farias, L. M. (2007). Production of antagonist substance with and without periodontal disease. J. Appl. Microbiol., 103: 245 – 251.

Bashan, Y. and Levanony, H. (1988). Active attachment of *Azospirillum brasilense* Cd to quartz sand and to a high – textured soil by protein binding. J. Gen. Microbiol., 134: 2269 – 2279.

Baure, A. W.; Kirby, W. M.; Sherris, J. C. and Turck, M. (1999). Antibiotic susceptibility testing by a standarized single disc method. A. M. J. Clin. Pathol., 45: 493 – 496.

Bazaka, K.; Crawford, R. J.; Nazarenko, E. L. and Ivanova, E. P. (2011). Bacterial extracellular polysaccharides. Adv. Exp. Med. Biol. 715: 213 – 226.

Beck, J. D.; Slade, G. and Offenbacker, S. (2000). Oral disease, vascular disease and systemic inflammation. Periodontal, 23: 110 – 120.

Bedran, T. B. L.; Azelmat, J.; Spolidorio, D. and Grenier, D. (2013). Fibrinogen-induced *Streptococcus mutans* biofilm formation and adherence to endothelial cells. BioMed. Res. Int., 10: 1155 – 1163.

Beighton, D.; Hardie, J. and Whiley, R. (1991). A scheme for the identification of viridance streptococci. J. Med. Microbiol., 35: 367 – 372.

Bendough, Z.; Barbeau, J.; Hamad, W. and Desrosisers, M. (2006). Biofilm prmation by *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas eaurginosa* is associated with an un favorable evolution after surgery for chronic sinusitis and nasal polyposis. "Otolaryngology" Head and Neck Surgery J., 134(6): 345 – 355.

Berkowitiz, R. J. and Jones, P. (1985). Mouth to mouth transmission of bacterium *Streptococcus mutans* between mother and child. Arch. Oral Biol., 30: 377 – 379.

Berman, J. and Sudbery, P. E. (2002). *Candida albicans*: a molecular revolution builds on lessons from budding yeasts. Nat. Rev. Gen., 3: 918 – 930.

, B.; Blackburn, B.; Evans, R. J. and Hugenholt, Z. (1996). Application of the bacteria. Antonio Vanleewen Hook, 69: 193 – 202.

Deman, J. C.; Rogosa, M. and Sharpe, M. E. (1996). A medium for the cultivation of lactobacillus. J. Appl. Bact., 23(1): 130 – 135.

Devuyst, L. and Vandamm, E. J. (1994). Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria Microbiology, Genetics and Application. 1st ed. Backie Academic and Professinol. Blegium.

Diaz, P. I. (2012). Microbial diversity and interaction in subgingiva; biofilm Commenities. Front Oral Biol., 15: 17 – 40.

Diebel, V. (2000). Biofilm. Interest J. Food Safety, 1: 6 – 7.

Donlan, R. M. (2002). Biofilm microbial life on surface. J. Emer. Infect. Disease, 8(9): 881 – 890.

Dorak, M. T. (2006). Real – Time PCR, Advanced Methods. (1st ed). Series, Oxford (U.K.), Taylor and Francis, PP: 16 – 30.

Dorak, M.; Tervli, K. (2009). Real Time PCR, electronic books.

Duarte, S.; Klein, M. I.; Aires, C. P.; Cury, J. A.; Bowen, W. H. and Koo, H. (2008). Influences of starch and sucrose on *Streptococcus mutans* biofilms. Oral Microbiol. Immunol., 23: 206 – 212.

Dune, C.; Mahony, L. O.; Murphy, L.; Thornton, G.; Morrissey, D.; Halloran, S.; Feeney, M.; Flynn, S.; Fitzgerald, G.; Daly, C.; Kiely, B.; Sullivan, G. C.; Shanahn, F. and Collinks, K. (2001). In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin correlation with *in vitro* finding. AM. J. Clin. Nut., 73: 386 – 392.

Ednes, F. W. (2003). An alternative for antibiotic use in poultrty probiotics. J. Rev. Bras. Sci. Avic., 5(2): 101 – 134.

Ellis, D.; Stephan, D.; Helen, A.; Rosemary, H. and Roben, B. (2007). Description of Medical Fungi. 2nd ed. Ltd. Australia, PP: 147 – 150.

Elmer, G. W.; Surawicz, M. C. and Mcfarland, L. V. (1996). Biotherapeutic agents. A neglected modality for the treatment and prevention of selected intestinal and vaginal infection. J. A.M. Asoc., 275: 870 – 876.

Emmons, C. W.; Binford, C. H.; Utz, J. P. and Kownchnny, K. J. (1977). Medical Mycology. 3rd ed. Henry Kimpton.

Engebrecht, J. and Silverman, M. (1987). Nucleotide sequence of the regulator locus controlling expression of bacterial genes for bioluminescence. Nucleic acid Res., 15: 10455 – 10467.

Englander, H. R.; Shklair, I. L. and Fosdick, L. S. (1959). The Effect of salvia on the pH and lactate concentration in dental plaque. J. Dent. Res., 38: 848 – 853.

Eso, J. G.; Measham, G. D.; Munro, J. and Green – Johnson, J. M. (2002). Immuno stimulatory action of lactobacilli mitogenic induction of antibody production and spleen cell proliferation by *Lactobacillus delbraeckii* sub sp. Bulgaricus and *Lactobacillus acidophilus*. Food and Agric. Immun., 14: 73 – 82.

Espinosa – Urgeal, M. (2003). Resident parking only: rhamnolipids maintain fluid channels in biofilm. J. Bacteriol., 185(3): 699 – 700.

Facklam, R. R. (1977). Physiological differentiation of viridance streptococci. J. Clin. Microbiol., 5: 184 – 201.

Farah, C. S.; Pang, E. G.; Gotjmanoa, T.; Seymour, G. J.; Calancy, R. L. and Ashman, R. B. (2001). T– cell augment monocyte and neutrophil function oropharyngeal candidiasis. Infect. Immun., 69: 6110 – 6118.

Farber, J. M. (1991). Microbiological aspects of modified atmosphere packaging technology. Rev. J. Food Port., 54: 58 – 70.

FDA (Food and Drug Administration) (2003). Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Food Bacteriological Analytical Manual. Chapter 10.

Fleming, H. P.; Mcfeeters, R. F. and Daeschel, M. A. (1986). The Lactobacilli, Pediocuccus and Leuconostoc Vegetable Products in Bacterial Starter Cultures for Foods. Ed. Gilliand, S. E. CRC Press Inc. Boco Raton. Florida, PP: 97 – 118.

Fletcher, M. (1988). Attachment of *Pseudomonas fluorescens* to glass and influence of electrolytes on bacterium – sub strain separation distance. J. Bacteriol., 170: 2027 – 2030.

Flynn, S.; Sinderen, D. V.; Thronton, G. M.; Hold, H. and Collins, J. K. (2002). Characterization of the genetics locus responsible for the production of ABP – 118. A novel bacteriosin product by the probiotic bacterium *Lactobacillus salivarius* sub sp. Salivarius UCC 118. Microbiol., 148: 973 – 984.

Fong, I. W. (2002). Infections and their role in atherosclerotic vascular disease. J. A. M. Dent. Assoc., 133: 75 – 135.

Fong, K. P.; Gao, L. and Demuth, D. R. (2003). *Lux* and *arcB* control aerobic growth of *Actinobacillus actinomycetem* comitias under iron limitation. Infect. Immun., 71: 298 – 308.

Francis, P. and Walsh, T. J. (1992). Current approaches to the management of fungal infection in cancer patient. Oncology, 6: 81 – 92.

Frandesn, E. V.; Pedrazzoli, V. and Killian, M. (1991). Ecology of viridians streptococci in the oral cavity and pharynx. Oral Microbiol. Immun. 6(3): 129 – 133.

Fritsche, T. R.; Swoboda, S. E.; Olson, B. J.; Moore, F. M.; Meece, J. K. and Novicki, T. J. (2011). Evaluation of The Sensititre ARIS2x and Vitek 2 Automated Systems for Identification of Bacterial Pathogens Recovered from Veterinary Specimens. Marshfield labs. Lacrosse Univ. Wisconsin. USA.

Fuda, C.; Suvorov, M.; Vakulenko, S. B.; and Mobashery, S. (2004). The basis for resistance to beta – lactam antibiotics by penicillin binding protein 2a of methicillin – resistant *Staphylococcus aureus*. J. Biol. Chem., 279: 40802– 40806.

Georg, L. K. (1970). Diagnostic procedures for the isolation and identification of the aetiologic agent of actinomycosis. In: proceeding of the international symposium on Mycoses. Washinghton, D.C. American, Health Orignazation Scientific Pub., No. 205. Sited by (Finegoled and Martin, 1982).

Ghasempour, M.; Rajabnia, R.; Irannejad, A.; Hamzeh, M.; Ferdosi, E. and Bagheri, M. (2013). Frequency, biofilm formation and acid susceptibility of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in saliva of preschool children with different levels of caries activity. Dent. Res. J., 10(4): 440 – 445.

Gibellini, D.; Vitone, F.; La placa, M. and Re, M. C. (2004). Quantitative dedection of human immuno deficiency virus type I (H1V-1) viral load by SYBR green real – time RT – PCR Technique in H1V-1 sero positive patients. J. Virol. Method, 113(2): 183 – 189.

Gibson, U. E.; Heid, C. A. and Williams, P. M. (1996). A novel method for real time quantitive RT – PCR. Genome Res., 6: 995 – 1001.

Gibson, G. R. and Roberfroid, M. R. (2008). Handbook of Probiotic. C.R.C. Press. USA.

Gilbert, P.; Maria – Litran, T.; Mc Bain, J.; Richord, A. H. and White, F. W. (2002). The physiology and collective recalcitrance of Microbial biofilm formation communities. Adv. Microb. Physiol., 46: 203 – 526.

Gillespie, S. H. and Hawkey, P. M. (2006). Principles and Practice of Clinical Bacteriology. 2nd ed. John Wiley and Sons Comp., England.

Glee, P. M.; Cutler, J. E.; Benson, E. E.; Bargatez, R. F. and Hazen, K. C. (2001). Inhibition of hydrophobic protein – mediated *Candida albicans* attachment to endothelial cells during physiological shear flow. Infect. Immun., 4: 2815 – 2820.

Goldin, B. R. and Gorbach, S. L. (1984). The effect of milk and Lactobacillus feeding on human intestinal bacterial enzyme activity. A.M. J. Clin. Nut., 39(5): 756 – 761.

Gould, G. W. (1991). Antimicrobial Compound. In: Biotechnology and Food Ingredients. 5th ed. Goldberg, I. and William, R. PP: 461 – 483.

, T. K. (2005). Development of a DNA vaccine against *Streptococcus mutans*: a novel approach to immunization against dental caries. Ph. D. Thesis, College of Arts and Sci., Univ. South Florida, USA.

Hardy, K. (1987). Bacterial Plasmids. 2nd ed. American Society for Microbiology. USA.

Harley, J. P. and Prescott, L. M. (1996). Laboratory Exercises in Microbiology. 3rd ed. McGraw-Hill Comp., USA.

Harrigan, W. F. and Maccance, M. E. (1976). Laboratory Method in Food and Diary Microbiology. Academic Press. London.

Harriott, M. M. and Nover, M. C. (2011). *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* firm poly microbial biofilm: effect on antimicrobial resistance. Am. Soc. Microbiol., 30: 306 – 327.

Hasslof, P.; Hedberg, M.; Twetman, S. and Blicks, C. S. (2010). Growth inhibition of oral mutans streptococci and candida by commercial probiotic lactobacilli – an *in vitro* study. B.M.C. Oral Health, 10(18): 1472 – 1488.

Haung, L.; Forsberg, C. W. and Gibbins, L. N. (2008). Influence of external pH and fermentation products and *Closteridium acetobutylicum* interacellular pH and cellular distribution of fermented products. J. Appl. Environ. Microbiol., 51: 1230 – 1234.

Hawthorn, L. A. and Reid, G. (1995). Exclusion of uropathogen adhesion to polymer surfaces by *Lactobacillus acidophilus*. J. BioMed., Mater. Res., 24: 39 – 46.

Hellemans, J.; Mortier, G.; Coucke, P.; Depaepe, A.; Speleman,F. and Vandesompele, J. (2006). 9 Base: open source relative quantification software for management and automated analysis of real – time quantitative PCR data (submitted to Bio techniques).

Herigstad, B.; Hamilton, M. and Heersink, J. (2001). How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. J. Microb. Meth., 44: 121 – 129.

Higuchi, R.; Fockler, C.; Dollinger, G. and Watson, R. (1993). Kinetic PCR analysis: real time monitoring of DNA amplification reaction. Biotechnol., 11: 1026 – 1030.

Hilman, J. and Socransky, S. (1989). The Theory and Application of Bacterial interference to oral disease. In: Myers, H. (Ed.). New Biotechnology in Oral Research. Basel: Kerger, 1 – 17.

Hilson, S. (1996). Dental Anthropology. New York: Cambridge Univ. Press, USA.

Hiramatsu, K.; Cui, L.; Kuroda, M. and Ito, T. (2001). The emergence and evolution of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Trends. Microbiol., 9: 486 – 493.

Histov, A.; Mcallister, T. A. and Cheng, K. G. (1998). Effect of dietary or abomasal supplementation of exogenous polysaccharide degrading enzyme on rumen fermentation and nutrient digestibility. J. Animal Sci., 78: 314 – 315.

Holit, J. G.; Krieg, N. R.; Sneath, P. H.; Staley, J. T. and Williams, S. T. (1994). Bergyes Manual of Determinative Bacteriology. 9th ed. Williams and Wilkins. Baltimore.

Holit, J. G.; Kriey, N. R. and Sneath, P. H. (1999). Berges Manual of Determinative Bacteriology. William and Wilkins. Philadelphia.

Holzapfel, W. H.; Harberer, P.; Geisen, R.; Bjorkrothg, J. and Schillinger, V. (1998). Taxonomy and important feature of probiotic microorganism in food and nutrition from the institute of hygiene and toxicology. Probiol. J. 1(26): 1 – 10. USA.

Hotchkiss, J. H.; Chen, J. H. and Lawless, H. T. (1999). Combined effect of carbon dioxide addition and barrier films on microbial and sensory of changes in pasteurized milk. J. Dairy Sci., 82: 690 – 695.

Isolari, E.; Sutas, Y.; KanKaanpaa, P.; Arvilommi, H. and Salminin, S. (2001). Probiotics: effects on immunity. A.M. J. Clin. Nut., 73(Suppl): 4445 – 4505.

Jenkinson, H. F.; Lamount, R. J. (2005). Oral microbial communities in sickness and in health. Trend Microbiol., 13(12): 589 – 595.

Joklik, W. K.; Willett, H. P. and Amos, D. B. (1984). Zinsser Microbiology, 8thed. Appleton – century craft, Norwalk, Connecticut, USA.

Jones, G. W. and Rutter, J. M. (1972). Role of K 88 antigen in the pathogenesis of neonatal diarrage caused by *Escherichia coli* in piylets infections. J. Immun., 6: 918 – 927.

Jordan, H. V. and Hammond, B. F. (1972). Filamentous bacteria isolated from human root surface caries. Arch. Oral. Biol., 17: 13331 – 13341.

Jordan, H. V.; Keyes, P. H. and Blellacko, S. (1972). Periodontal lesions in hamsters and gonotbiotic rats infected with actinomyces of human origin. J. Periodental. Res., 7: 6 – 21.

Jorgensen, J. H.; Crwford, S. A.; McElmeel, M. L. and Fiebelkorn, K. R. (2004). D–zone test clindamycin resistance of staphylocci in conjunction with performance of automatically detection. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 42: 1800 – 1802.

Juven, B. J.; Schred, F. and Liner, P. (1992). Antagonism compound produced by chiken intestinal strain *L. acidophilus*. J. Food Prot., 55: 157 – 161.

Kailasopathy, K. and Chin, J. (2000). Survival and potential therapeutic effect of probiotic organism with refrence to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. Immun. Cell Biol., 78: 80 – 88.

Kandler, O. and Weiss, N. (1986). Genus Lactobacillus. In: Bergy's Manual of Systemic Bacteriology. Smeath, P. A.; Mair, N. S. and Hold, J. G. (2^{nd} ed). William and Wilkins Comp., Baltimore, USA.

Kapner, M. (2003). Comprehesive and Aesthetic Dentistry. New Rochelle, N. Y. (Ed.). Ninth District Dental Association.

Kawamura, Y.; Hou, X. G.; Sultana, F.; Liu, S.; Yamamoto, H. and Ezaki, T. (1995). Determination of *16s* rRNA sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetic relationships among members of the genus Streptococcus. Int. J. Syst. Bacteriol., 45: 406 – 408.

Keren, I.; Shah, D.; Spoering, A.; Kadalu, N. and Lewis, K. (2004). Specialized per sister cells and the mechanism of multi drug tolerance in *E. coli* bacterial. 186: 8172 – 8180.

Kilian, M.; Mik, K.; Elson, L. and Henrichson, J. (1989). Taxonomic study of viridance streptococcus: Description of *Streptococcus gordonii* and emended description of *S. sanguis* (White and Viren, 1946) and *S. oralis* (Bridge and Sneath, 1988) and *S. mitis* (Andrewes and Horder, 1906). Int. J. Syst. Bacterial, 39: 471 – 484.

Kim, K. Y. and Frank, J. F. (1995). Effect of nutrients on biofilm formation by listera monocyte genes on stainless steel. J. Food Prof., 58(1): 24 – 28.

Kleerebezem, M.; Quadri, L. E.; Kuipers, O. P. and de Vos, W. M. (1997). Quorum sensing by peptide pherom once and two – component signal transducation system in gram positive bacteria. Mol. Microbiol., 24: 894 – 904.

Kleinberg, I. (2002). A mixed – bacterial ecological approach to understanding the role of oral bacteria in dental caries causation: an alternate to *Streptococcus mutans* and the specific – plaque hypothesis. Crit. Rev. Oral Biol. Med., 13: 108 – 125.

Kleter, G.; Lammers, W. L. and Vos, E. A. (1984). The influence of pH and concentration of lactic acid and NaCl on the growth of *Clostridium tyrobutyricum* in cheese. J. Neth Milk Dairy, 38: 31 – 41.

Kolenbrander, P. E.; Anderson, R. N.; Blehert, D. S.; Gland, P. G.; Foster, J. S. and Palmer, R. J. (2002). Communication among oral bacteria. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 66(3): 486 – 505.

Kolenbrabder, P. E.; England, P. G.; Diaz, P. I. and Palmer, J. R. J. (2005). Genome – genome interactions: bacterial communities in initial dental plaque. Trends Microbiol., 13: 11 – 15.

Koneman, K. S. and Loesche, W. J. (1978). New medium for isolation of *Actinomyces viscosus* and *Actinomyces naeslundii* from dental plaque. J. Clin. Microbiol., 7(5): 4 – 8.

Kopec, L. K.; Vacca – Smith, A. M. and Bowen, W. H. (1997). Structural aspect of glucan formation solution and surface of hydroxyapatite of enamed. J. Dent. Res., 7(7): 929 – 34.

Krehbeil, C. R.; Rust, S. R.; Zhang, G. and Gilliland, S. E. (2003). Bacterial direct – fed microbial in remint diet: performance respone and mode of action. J. Animal Sci., 81: 120 – 132.

Kuramitsu, H. K. (1993). Virulence factors of mutans streptococci: role of molecular genetics. Crit. Rev. Oral Biol. Medicine, 4(2): 159 – 176.

Kuramitsu, H. K. (2001). Virulence properties oral bacteria impact of molecular biology. Curr. Mol. Biol., 3(2): 35 – 36.

Kuramitsu, H. K.; He, X.; Lu, X. R.; Anderson, M. H. and Shi, W. (2007). Interspecies interaction within oral microbial communities. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 71(4): 653 – 670.

Lal, D.; Verma, M. and Lal, R. (2011). Exploring internal features of 16s rRNA gene for identification of clinically relevant species of the genus streptococcus. Annals Clin. Microbiol. Antimicrob., 10: 28 – 39.

Lamont, R. J. and Jenkinson, H. F. (2010). "Oral Microbiology ata Glance" Wiley Blackwell. Singapore, Hong Kong.

Landman, D. (2001). Management of infections due to resistance *Staphylococcus aureus*. A. M. J. Infect., 30: 250 – 255.

Lappin – Scott, H. (2003). Microbial Biofilms. Cambridge: Cambridge Univ. UK.

Law, V.; Seow, W. K. and Townsend, G. (2007). Factors influencing oral colonization of mutans streptococci in young children. Australian Dent. J., 52(2): 93 – 100.

Lazazzera, B. A. (2000). Quorum sensing and starvation: signals for entry into the stationary phase. Cur. Opin. Microbiol., 3: 177 – 182.

Leclercq, R. and Courvalin, P. (1999). Bacterial resistance to macrolide, lincosamide and streptogramin antibiotics by target modification. Antimicrob. Agents Chemother., 35: 1267 – 1272.

Lee, Y. K.; Puony, K. Y.; Oawehoond, A. C. and Salminin, S. (2003). Displacement of bacterial pathogens from mucus and caco cell surface by lactobacillus. J. Med. Microbiol.; 52(10): 925 – 930.

Lehner, C.; Cole, M. F.; Bryan, M. K.; Evans, C. L.; Pearce, M. J.; Sheridan, P. A. and Sura, R. L. (1996). Humeral immunity to commensal oral in human infant salivary secretary Iga. Ab. reactive with *S. mitis, S. mutans, S. oralis* and *S. fecalis* during first two year of life. Infect. Immun., 67: 1878 – 1886.

Leme, A. F. P.; Koo, H.; Bellato, C. M.; Bedi, G. and Curry, J. A. (2006). The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation – new insight. J. Dent. Res., 85(10): 878 – 887.

Lewis, K. (2001). Riddle of biofilm resistance antimicrobial. Agents Chemother., 45: 999 – 1007.

Li, C. and Yu – Mei, W. (2011). The role of bacterial biofilm in persistent infections and control strategies. Int. J. Oral Sci., 3: 66 – 73.

Li, Y. and Burne, R. A. (2013). Regulation of the *gtfBC* and *ftf* genes of *Streptococcus mutans* in biofilms in response to pH and carbohydrate. Microbiol., 147: 2841 – 2848.

Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real time quantification PCR and the $2^{\Delta\Delta CT}$ method. Methods, 25(4): 402 – 408.

Loeche, W. J. (1986). Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. Microbiol. Rev., 50: 353 – 380.

Macfaddin, J. F. (2000). Biochemical Test for Identification of Medical Bacteria. 3rd ed. Williams and Wilkins. Baltimore. USA.

Mack, D. R.; Ahrne, S. L.; Wei, S. and Holing – Swarth, M. A. (2003). Extracellular Mvc3 mucin secretion follows adherence of lactobacillus strain to intestinal epithelia cell in vitro. J. Cut., 52: 234 – 248.

Madhu, A.; Sharma, PT. B. D. and Yadav, S. (2008). Biofilms: microbes and disease. Brazilian J. Infect. Diseases, 121(6): 526 – 530.

Mainiatis, T.; Fritsch, E. F. and Sambrook, J. (1982). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Marsh, P. and Martin, M. V. (1999). Oral Microbiology 4th ed. Wright, Oxford, U.K.

Marsh, P. D. (2006). Dental plague; biological significance of biofilm and community life – style. J. Clin. Periodontal, 32: 7 – 15.

Mastumoto, M.; Ohishi, H. and Benno, Y. (2001). Impact of LKM512 yoghurt on improvement of in testinal environment of the elderly. F.E.M.S. J. Immun. Med. Microbiol.; 31(3): 181 – 186.

Mathur, T.; Singhal, S.; Khan, S.; Upadhyay, D. J.; Fatma, T. and Rattan, A. (2006). Detection of biofilm formation among the clinical isolates of staphylococci: an elevation of three different screening methods. India J. Med. Microbiol., 24(1): 25 – 29.

McCarty, M. (1990). Streptococcus In: Davis, B. D.; Rulbeco, R.; Eiscn, H. N. and Ginsberg, H. C. (eds.). Microbiology, 4th ed., Lippinciy Comp., Philadelphia.

Metchnikoff, E. (1970). The Prolongation of Life. In optimistic studies (Heineman W., Ed.) PP:1 – 100. G.P. Putnam and Sons, London, UK. Cited by Azizpour, K., Bahrambeygi, S., Mahmoodpour, S. and Azizpour, A. (2009). History and basic of probiotics. Res. J. Bio. Sci., 4: 409 – 429.

Meurman, J. H. (2005). Probiotics: Do they have role in oral medicine and dentistry. Eur. J. Oral Sci., 113: 188 – 196.

Mishra, C. and Lambert, J. (1996). Production of antimicrobial substances by probiotics. Asia Pacific J. Clin. Nut., 5: 20 – 24.

Miyazaki, H. and Morimoto, M. (1996). Changes in caries prevalence in Japan. Eur. J. Oral Sci., 104: 452 – 458.

Morishita, Y.; Mistsuo, K. A.; Kanruchi, C.; Yamamoto, S. and Ogata, M. (1981). Specific establishment of lactobacillus in the digestive tract of germ free chicken. Japan. J. Microbiol., 15: 531 – 538.

Naglik, J. R.; Challacombe, S. J. and Hube, B. (2003). *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 67: 400 – 428.

Nagoba, S. N.; Rao, K. P.; Sameer, S.; Gujralhi, D. S. and Nagoba, B. S. (2011). Studies on candy based ketoconazole pediatric table lozenges. J. Med. Sci., 2(1): 239 – 243.

Najjer, T. (2004). Bacterial Mouth Infection, Medicine Instant Access to the Mind of Medicine. Washington, D. C., USA.

Narendranth, N. V.; Hynes, S. H.; Thomas, K. C. and Ingledew, M. W. (1997). Effect of lactobacillus and yeast. Catalyzed ethanol fermentation. J. Appl. Environ. Microbiol., 63(11): 4158 – 4163.

NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) (2003). Performance standards for disks susceptibility testing; approved standard, 6th ed. PP: 100-113, Wayne, Pennsylvania, USA.

Netting, J. (2001). Sticking situation. The Weekly News Magazine of Science, 160(2): 28 – 43.

Newburn, E. (1978). Cardiology. Baltimore, Williams and Wilkins. Com. USA.

Nobile, C. J.; Bruno, V. M.; Richard, M. L.; Davis, D. A. and Mitchell, A. P. (2003). Genetic control of chlamydospore formation in *Candida albicans*. Microbiol., 149: 3629 – 3637.

Nolte, W. A. (1982). Oral Microbiology with Basic Microbiology and Immunology. 4th ed. The C.V. Mosby Comp., London.

Nylander, A.; Kumlin, L.; Martinsson, M. and Twetman, S. (2001). Effect of school based preventive program with salivary lactobacillus counts as sugar – motivating tool on caries increment in adolescents. Acta. J. Dent. Sci., 14: 88 – 92.

Ochsner, L. and Traris, (2006). Oral hygiene habits and bacterial population: A comparison of lactobacillus and streptococcus bacteria, saint martins. Univ. J., 5: 674 – 688.

Ogawa, A.; Furukawa, S.; Fujta, S.; Mitobe, J.; Kawari, T.; Narisawa, N.; Sekizuka, T.; Kuroda, M.; Ochiai, K.; Ogihara, H.; Kosono, S.; Yoneda, S.; Watanabe, H.; Morinage, Y.; Uematsu, H. and Senpuku, H. (2011). Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm formation by *Streptococcus salivarius fruA*. A. M. Soc. Appl. Eviron. Microbiol., 77(5): 1572 – 1580.

Oshima, T.; Master Mura, M.; Hoshino, T.; Kawabata, S.; Sobue, S. and Fujiwara, T. (2001). Contribution of three glycosyl tranferase to sucrose – dependent adherence of *Streptococcus mutans*. J. Dent. Res., 80: 1672 – 1677.

Parsek, M. and Singh, P. (2003). Bacterial biofilm can emerging link to disease pathogenesis. Annul. Rev. Microbiol., 45: 50 – 55.

Patterson, T. F.; McGinnis, M. R.; Arikan, S.; Rex, J. W. and Rodrigues, L. (2004). *Candida albicans*. (www.doctor fungus.com).

Petersilka, G. J. (2011). Subjngiral air – polishing in the treatment of periodontal biofilm. Periodontal, 55(1): 124 – 42.

Piarde, J. C.; Kuipers, O. P.; Rollema, H. S.; Oesmazeaad, M. J. and Devos, W. M. (1993). Structure organization and expression of let gene for Lacticin 481, a novel antibiotics produced by *Lactococcus lactis*. J. Biol. Chem., 268: 16361 – 16368.

Poirel, L.; Leviandier, G. and Nordman, N. (2006). Prevalence and genetic analysis of plasmid mediated quinolone resistance determinants QnrA and QnrS in enterobacteriaceae isolates from a frnch university hospital. A.M. Soc. Microbiol., 65: 3992 – 3997.

Popadiak, K.; Potempa, J. and Riesbeck, K. (2007). Biphasic effect of gingipains from porphyromonas gingivalis on the human complement system. J. Immunol., 60: 7242 – 7250.

Pospiech, T. and Neumann, J. (1995). In genomic DNA isolation. Kieser, T. (eds). John Innes Center. Norwich. NR47UH. U.K.

Pulcini, E. D. (2001). Biofilms: sensing and signaling. J. Cal. Dent. Assoc., 29(9): 194 – 198.

Pyrdy, M. A.; Tenovuo, J.; Pruift, K. M. and White, W. E. (1983). Effect of growth place and cell envelope structure on susceptibility of *Salmonella typhimurium* to the *Lactoperoxidase thiocyanate* hydrogen peroxide system. J. Infect. Immun., 39: 1187 – 1195.

Rafey, A. N. I.; Homer, K. A. and Beighton, D. (1996). Effect mucin and glucose on proteolytic and glycosidic activities of *Streptococcus oralis*. J. Med. Microbiol., 44: 409 – 417.

Reid, G. (1999). The scientific basis for probiotic strains for lactobacillus. J. Appl. Environ. Microbiol., 65: 3763 – 3766.

Reid, G.; Sanders, M. E.; Gas Kins, H. R.; Gibson, G. R.; Mercenier, A.; Rastall, R.; Roberfroid, M.; Rowland, I.; Christine, C. and Klaenhammer, T. R. (2003). New scientific paradigms for probiotics and probiotic. Clin. Gastroeterol, 37(2): 105 – 118.

Riley, M. A. (1998). Molecular mechanism of bacteriocins evolution. Anna. Rev. Gene, 32: 255 – 278.

Roa, C. V.; Sanders, M. E.; Indranie, C.; Simi, B. and Reddy, B. S. (1999). Prevention of colonic prevenoplastic lesions by the probiotic Lactobacillus acidophilus NCFM in F344 rats. Int. J. Onco, 14: 934 – 944.

Roberts, M. C. (2002). Antibiotic toxicity, interactions and resistance development. Periodontology, 28: 28 – 297.

Rogers, A. H. (2008). Molecular Oral Microbiology. Caister Academic Press.

Rolfe, R. D. (2000). The role of probiotic culture in the control of gastro intestinal health. J. Nut. Bio., 44: 3965 – 4023.

Romani, L. (2004). Immunity to fungal infections. Nat. Rev. Immun., 4: 1- 13.

Rosan, B. and Lamount, R. J. (2000). Dental plaque formation. Microbes Infect., 2(13): 1599 – 1607.

Ross, P. W. (1971). Quantitative studies on the salivary flora. J. Clin. Pathol., 24: 717 – 722. (Cited by Nolte, 1982).

Rouabhia, M. and Chmielewski, W. (2012). Disease associated with oral poly microbial biofilms. The open Mycol. J., 6: 27 – 32.

Runar, S. (1998). Biology of: nisin a genetically approach instate of biotechnology and department of bioscience, division of genetics university of Helsinki (personal communication). FEMS. J. Microbiol., 16: 75 – 79.

Ryan, K. J. and Ray, C. G. (2004). Introduction to Infectious Diseases: Sherris Medical Microbiology. 4th ed. McGraw–Hill, New York, USA.

Ryder, M. A. (2005). Cather-related infection it's all about biofilm. Advanced Practice Nursing, 5(3): 1 – 15.

Saarela, M.; Mogenson, G.; Fonden, R.; Matto, J. and Mattila-Sandholm, T. M. (2002). Probiotic bacteria: Safely, functional and technological properties. J. Biotechnol., 10: 197 – 213.

Sainie, S.; Mahajan, A.; Sharma, J. K.; Arora and Saini, O. P. (1999). Polymicrobial etiology of dental caries. Indian J. Pathol. Microbiol., 42(1): 9 – 25.

Salminen, S. and Von Wright, A. (1998). Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects. New York, Marcl Dekker, USA.

Samaranayak, L. P.; Jones, B. M. and Scully, C. (2002). Essential Microbiology for Dentistry, 2nd ed. Chapter 31, Churchill Livingston, Hong Kong.

Sambrook, J.; Maccallum, P. and Russel, D. (2001). Molecular cloning: a laboratory manual, 3nd ed. Cold Springs Harbor Press, New York, P: 2344.

Sandersm, W. and Sanders, C. (1984). Modification of Normal Flora by Antibiotics: effect on individuals and the environmental therapy. New York: Churchill Livingston.

Schoustra, S. E.; Dench, J.; Dali, R.; Aaron, S. D. and Kassen, R. (2012). Antagonistic interactions peak at intermediate genetic distance in clinical and laboratory strains of *Pseudomonas aeruginosa*. B.M.C. Microbiol., 12: 40 – 49.

Scuphach, P.; Osterwalder, V. and Guggen heim, B. (1995). Human Root Caries: microbiota in plaque corering sound, carious and arrested carious root surfaces. Caries Res., 29: 282 – 295.

Servin, A. L. (2004). Antagonism activates of Lactobacilli and bifido bacterium against microbial pathogens. FEMS. Microbiol. Rev., www.femsMicrobiology.org

Shemesh, M.; Tam, A. and Steinberg, D. (2007). Expression of biofilm – associated gene of *Streptococcus mutans* in response to glucose and sucrose. J. Med. Microbiol., 56: 1528 – 1535.

Thomus, L. V.; Wimpenny, J. W. T. and Barker, G. C. (1997). Spatial interaction between sub surface bacterial colonies in a model system aterritory model describing the inhibition of Listeria monocytogenes by anisin – producing lactic acid bacterium. J. Microbiol., 143: 5275 – 2582.

Toago, M. A.; Fereus, S. B. and Mutukumira, A. N. (2002). Identification of lactic acid bacteria from opaque beer for potential use as a starter culture. J. food Technol. Afric., 7(3): 93 – 97.

Todar, K. (2008). Microbial World. (Microbe and Dental Disease). Univ. Wisconsin – Madison, PP: 375 – 390.

Tortora, G. J.; Funke, B. R. and Case, C. L. (2001). Microbiology, Cumming Publishing Comp., California, USA., PP: 395 – 442; 658 – 662.

Vezquez, J. A. and Sobel, J. D. (2002). Mucosal candidiasis. Infect. Dis. Clin. J., 16: 793 – 820.

Visick, K. L. and Fuqua, C. (2005). Decoding microbial chatter: cell – cell communication in bacteria. J. Bacteriol., 187(16): 5507 – 5519.

Waltimo, T. M. T.; Siren, E. K.; Torkko, H. L. K.; Olsen, I. and Hapaselo, M. P. P. (1997). Fungi in therapy – resistant apical periodontitis. Int. Endod. J., 30: 96 – 101.

Walton, A. G.; Welbury, R. R.; Thomason, J. M. and Foster, H. E. (2005). Oral health and juvenile idiopathic arthris: A review British society for Rheumatology, Oxford J. Oxford Univ. Press.

Wang, G. and Hardy, M. P. (2004). Development of leydig cells in the insulin- ike growth factor-I (igf-I) knockout mouse: effects of igf-I replacement and gonadotropic stimulation. Biol. Rep., 70: 632 – 639.

Wanger, R. D.; Warner, T.; Dohnalk, M.; Farmer, J.; Roberts, L. H.; Hy, M. and Balish, E. (1997). Biotherapentic effect of probiotic bacteria on candidiasis on immuo deficient Mice. J. Infect. Immun., 65: 4164 – 4178.