CC BY

DOR 20.1001.1.17354226.1400.16.2.5.0

Original article

Evaluation of the effect polysacharid nanocomposites on *gtf* gene expression in *Streptococcus mutans*

Shokofeh Mazhab jafari [1], Fatemeh Yazdian [2*], Farzaneh Hosseini [3*], Behnam Rasekh [4]

1. Bioscience college, Tehran North Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Department of Life Science Engineering, Faculty of New Science and Technologies, University of Tehran, Tehran, Iran
3. Environment & Biotechnology Division, Research Institute of Petroleum Industry (RIPI), Tehran, Iran

***Corresponding author:** e-mail: yazdian@ut.ac.ir, Hosseinimicrobiology@gmail.com

Received: 11/24/2021 Accepted:06/01/2022

Abstract

Tooth decay is one of the most important public health problems in different communities. The activity of acid-producing bacteria, especially Streptococcus mutans biofilms, is the main cause of this complication. The formation of biofilms of this bacterium depends on the presence of the enzyme glucosyltransferase, which is encoded by the *gtf* gene. The aim of this study was to evaluate the effect of polysaccharide nanocomposite of Chitosan (Cs)/Carboxymethyl Starch (CMS)/Graphene oxide (RGO)/Silica (SiO_2) on *gtf* gene expression in *Streptococcus mutans.* Graphene oxide was synthesized by Hummers method. Chitosan/Carboxymethyl Starch/Graphene oxide/Silica quaternary compound were then prepared and antimicrobial effect was investigated and antimicrobial effect on *Streptococcus's mutans* ATCC 35668 was investigated by microdilution method. The morphology and structural properties were investigated by FTIR, SEM and DLS. The expression of *gtfB, gtfC, gtfD* genes was examined by RT-PCR technique. FTIR studies confirmed the incorporation of RGO and SiO_2 into nanocomposite. The antimicrobial effect of nanocomposite (0.203 mg/ml) was obtained.

RT-PCR results showed that no significant relationship was observed in the expression of *gtfB* and *gtfD* genes in cells treated with nanocomposites compared to the control group (P=0.187, P=0.067), while the expression of *gtfC* gene was significantly reduced (P=0.049) in cells treated with nanocomposite and indicating the strong effect of this nanocomposite on suppressing the *gtfC* gene and reducing biofilm formation. According to the results, the expression level of *gftC* gene in cells treated with nanocomposite was reduced, and Cs/CMS/RGO/SiO_2 nanocomposite has a strong effect in suppressing *gtfC* gene.

Keywords: Gene expression, *Streptococcus mutans,* Polysaccharide, Dental biofilm

مقاله تحقیقی

ارزیابی تأثیر نانوکامپوزیت پلی‌ساکاریدی بر بیان ژن *gtf* در *استرپتوکوکوس موتانس*

شکوفه مذهب‌جعفری[1]، فاطمه یزدیان[2,*]، فرزانه حسینی[1,*]، بهنام راسخ[3]

۱. دانشکده علوم زیستی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲. گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۳. گروه پژوهش میکروبیولوژی و بیوتکنولوژی، پژوهشگاه صنعت نفت (RIPI)، تهران، ایران

***مسئول مکاتبات:** Hosseinimicrobiology@gmail.comyazdian@ut.ac.ir

محل انجام تحقیق:

تاریخ دریافت:۱۴۰۰/۹/۳ تاریخ پذیرش:۱۴۰۰/۱۰/۱۶

چکیده

پوسیدگی دندان از مهم ترین معضلات سلامت عمومی در جوامع مختلف می‌باشد. فعالیت باکتری‌های تولید کننده اسید به ویژه بیوفیلم‌های *استرپتوکوکوس موتانس* اصلی‌ترین عامل ایجاد کننده این عارضه محسوب می‌شود. ایجاد بیوفیلم‌های باکتری مذکور منوط به حضور آنزیم گلوکوزیل ترانسفراز است که توسط ژن *gtf* کدگذاری می‌شود. هدف از این مطالعه ارزیابی تأثیر نانوکامپوزیت پلی‌ساکاریدی کیتوزان/کربوکسی‌متیل‌نشاسته/گرافن‌اکسید/سیلیسیوم‌دی‌اکسید(Cs-CMS-RGO-SiO_2)،بر میزان بیان ژن‌های *gtfD, gtfC, gtfB* در *استرپتوکوکوس‌موتانس* با استفاده از روشRT-PCR در تشکیل بیوفیلم دندانی است. گرافن-اکسید به‌روش هامرز سنتز شد، سپس ترکیب دوگانه گرافن‌اکسید/سیلیسیوم‌دی‌اکسید و ترکیب چهارگانه کیتوزان/کربوکسی-متیل‌نشاسته/گرافن‌اکسید/سیلیسیوم‌دی‌اکسید تهیه شدند و اثر ضدمیکروبی آن‌ها روی باکتری *استرپتوکوکوس‌موتانس* ATCC 35668و با روش میکرودایلوشن بررسی گردید. مورفولوژی و خصوصیات ساختاری نانوکامپوزیت توسط FTIR، SEM و DLS مورد بررسی قرار گرفت. بیان ژن‌های *gtfD, gtfC, gtfB* با تکنیک RT-PCR بررسی شد. تحلیل داده‌ها توسط نرم‌افزار $SPSS_{22}$ و مقایسه میانگین‌ها براساسANOVAدر سطح ۰/۰۵ انجام شد. اندازهٔ ذرات نانوکامپوزیت کیتوزان/کربوکسی‌متیل‌نشاسته/گرافن-اکسید/سیلیسیوم‌دی‌اکسید در محدوده ۲۵/۳ - ۲۱/۱۹ نانومتربه‌دست آمد. نتایج طیف FTIR نشان‌دهنده تشکیل پیوند بین گرافن‌اکسید و سیلیسیوم دی‌اکسید، در نانوکامپوزیت می‌باشد. اثر ضدمیکروبی نانوکامپوزیت (۰/۲۰۳ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر) به-دست آمد. نتایج RT-PCR نشان داد، بیان ژن*gtfC* به‌طور معناداری (P=۰/۰۴۹) درسلول‌های‌باکتری *استرپتوکوکوس‌موتانس* تحت درمان با کیتوزان/کربوکسی‌متیل‌نشاسته/گرافن‌اکسید/سیلیسیوم‌دی‌اکسید کاهش داشته، که نشان‌دهنده اثر قوی این نانوکامپوزیت در سرکوب ژن*gtfC* و کاهش تشکیل بیوفیلم است. ارتباط معناداری در بیان ژن‌های *gtfB* و*gtfD*، در سلول‌های تیمار شده با نانوکامپوزیت نسبت به گروه کنترل مشاهده نشد (P=۰/۱۸۷, P=۰/۰۶۷). طبق نتایج میزان بیان ژن *gftC* در سلول‌های تحت درمان با نانوکامپوزیت کاهش داشته و این نانوکامپوزیت داری اثر قوی در سرکوب ژن*gtfC* و کاهش تشکیل بیوفیلم میکروبی دندان است.

واژه‌های کلیدی: بیان ژن gtf، *استرپتوکوکوس‌موتانس*، پلی‌ساکاریدی، بیوفیلم دندانی

مقدمه

پوسیدگی ناشی از رشد بیش ازحد گروه خاصی از میکروارگانیسم‌ها در سطح دندان و تخریب بافت‌های دندانی از طریق اسیدهایی است که باکتری‌ها را به شکل گروهی از پلاک‌های دندانی ایجاد می‌کنند. پلاک‌هایی روی دندان شکل می‌گیرد که باعث پوسیدگی آن می‌شود (۱و۲). در مرحله اول تشکیل پلاک، با تولید ترکیبات بیوشیمیایی مؤثر اتصال اولیه رخ داده و کلونی اولیه تشکیل می‌شود. در مرحله دوم باکتری‌ها قادر به اتصال به کلونی اولیه، تشکیل یک ساختار منحصربه‌فرد را داده و موجب مقاوم شدن آن‌ها به عوامل ضدمیکروبی می‌گردند.

به این ساختارهای ثانویه شامل چندگونه باکتریایی، بیوفیلم گفته می‌شود (۳). از دلایل اصلی پوسیدگی دندان، تخمیر کربوهیدرات‌ها به‌دلیل فعالیت میکروارگانیزم-ها می‌باشد. طبق تحقیقات اکثر باکتری‌های جداسازی شده از جنس *استرپتوکوکوس* بوده و *استرپتوکوکوس-موتانس* عامل اصلی در پوسیدگی دندان است (۴). عوامل اصلی پاتوژنی *استرپتوکوکوس‌موتانس* که باعث تشکیل بیوفیلم موفق باکتری در دهان می‌گردند چسبندگی، توانایی تولید اسید و تحمل اسید می‌باشد. رژیم غذایی حاوی میزان بالای ساکاروز عاملی مثبت برای رشد و تشکیل بیوفیلم‌های *استرپتوکوکوس موتانس* می‌باشد، زیرا *استرپتوکوکوس‌موتانس* توانایی متابولیسم ساکاروز را بهتر از سایر باکتری‌های موجود در دهان دارا بوده و ساکاروز را به اسیدلاکتیک و گلوکان نامحلول در آب تبدیل می‌کند. گلوکان نامحلول از عوامل اصلی اتصال باکتری به دندان وایجاد پلاک‌دندانی می‌باشد و به‌وسیله گلیکوزیل-ترانسفرازها (*gtf*) از ساکاروز سنتز می‌گردد. این فرایند بیوشیمیایی منجربه ثابت‌شدن *استرپتوکوکوس‌موتانس* به-سطح دندان و ایجاد پلاک‌دندان است. *استرپتوکوکوس موتانس* حداقل سه نوع ژنوتیپ جداگانه *gtf* تولید می‌کند: ۱- *gtfB* گلوکان نامحلول در آب با پیوندهای ۳-۱ α تولید می‌کند. ۲- *GtfC* دو نوع گلوکان محلول و نامحلول با پیوندهای ۶-۱β تولید می‌کند. ۳- *gtfD* به‌صورت غالب‌تر گلوکان نامحلول با پیوندهای α تولید می‌کند.

هریک از انواع *gtf*ها نقش مجزا دارند اما دارای هم‌پوشانی هستند. *gtfC* تمایل به اتصال به بزاق پوشیده شده با هیدروکسی آپاتیت دارد. این اتصال باعث افزایش توانایی اتصال باکتری به سطح دندان می‌گردد. *gtfB* با تولید گلوکان نامحلول و اتصال محکم به باکتری‌ها باعث خوشه‌بندی سلول‌ها شده و انعطاف‌پذیری پلاک را به‌شدت افزایش می‌دهد. به‌نظر می‌رسد *gtfD* نقش غالب را در تولید گلوکان نامحلول در مراحل بعدی به‌عهده دارد (۵). در واقع، حذف ژن‌های *gtf C, B ,D* در *استرپتوکوکوس موتانس* منجر به کاهش تشکیل بیوفیلم با حداقل تراکم باکتری‌ها و پلی‌ساکاریدها داخل بدن می‌شود (۶). این امر نشان می‌دهد سرکوب ژن‌های *gtf* یک‌روش جایگزین برای مختل شدن فرایند تشکیل بیوفیلم است. روند تحقیقات اخیر به پیشگیری و کنترل فرایندتشکیل بیوفیلم اختصاص یافته است. داروهای انتخابی درمان عفونت‌های دهانی حاصل از *استرپتوکوکوس موتانس* به‌دلیل افزایش مقاوت آنتی‌بیوتیکی و مشکلات تغییر رنگ دندان معمولاً فقط در درمان‌های کوتاه مدت استفاده می‌شوند (۷). بر این اساس، تحقیقات حاضر روی توسعه عوامل جدید آنتی‌باکتریال که بتوانند بر این مقاومت غلبه کنند صورت می‌پذیرد (۸). یک گام اساسی برای رسیدن به این هدف توسعه روش-های ضدمیکروبی با نفوذ راحت در ساختارهای بیوفیلم است (۹). نانوذرات پلیمرهای طبیعی به‌نظر می‌رسد در درمان و کنترل بیماری‌های دهان و دندان و حامل‌های بیولوژیکی برای نقل و انتقال مواد به بیوفیلم مطلوب باشند (۱). کیتوزان قابلیت استفاده به‌عنوان یک ماتریکس به‌منظور دارو رسانی و طیف وسیعی از کاربرد در بیودنتال را دارد (۱۰). نشاسته پلی‌ساکارید طبیعی ارزان قیمت، زیست‌سازگار، زیست‌تخریب‌پذیر و غیرسمی است (۱۱). نشاسته‌کربوکسی‌متیل، به شکل تجربی به‌عنوان انتقال دهنده کارآمد دارو استفاده شده‌است(۱۲). اکسیدگرافن به-طور گسترده به عنوان کاندیدای امیدوار کننده برای کاربردهای زیست‌پزشکی و دارورسانی استفاده می‌شود (۱۳). نانوذرات سیلیس در پزشکی عمدتاً به‌عنوان حامل نانویی با هدف انتقال دارو یا ژن و عکس‌برداری استفاده می‌شوند(۱۴و۱۵). در پژوهش حاضر نانوکامپوزیت کیتوزان /کربوکسی‌متیل‌نشاسته/گرافن‌اکسید/سیلیسیوم‌دی‌اکسید ساخته شد و مورفولوژی، خصوصیات ساختاری و فعالیت ضدمیکروبی آن بررسی گردید، سپس با روش RT-PCR بیان‌ژن‌های *gtfD, gtfC, gtfB* توسط نانوکامپوزیت ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها

استرپتوکوکوس موتانس ATCC 35668 از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران (IROST) خریداری شد. کیتوزان (low M_W)، از شرکت مرک تهیه گردید. نانوذره (SiO_2 ۱۰ نانومتر، ۶۰۰ مترمربع بر گرم) از شرکت Lolitech تامین شد. دندان‌های سالم از دانشکده دندان-پزشکی دانشگاه تهران تهیه و توسط دستگاه برش Mecatome مدل Presi فرانسه به اندازه‌های برابر (۳ میلی‌متر) برش داده شد.

جهت تعیین خصوصیات ساختاری و مورفولوژی نانوکامپوزیت، اندازه‌گیری متوسط سایز ذرات و PDI از دستگاه‌های FT-IR مدل ۱۰.۰۳.۰۶، شرکت

Perkin Elmer Spectrum، میکروسکوپ الکترونی روبشی مدل KYKY_EM۳۲۰۰، اسپکتروفوتومتر مدل PG Instrument، دستگاه تفرق نور دینامیک (DLS) مدل Nano zetasizer ساخت شرکت Instrument Malvern، دستگاه انکوباتور مدل Binder و شیکرانکوباتور مدل IKA و دستگاه سانتریفیوژ مدل Sigma استفاده شد.

آماده‌سازی نانوذرات کیتوزان و کربوکسی‌متیل-نشاسته

نشاسته طی فرآیند اتری شدن در ایزوپروپانول/آب به کربوکسی‌متیل‌نشاسته تبدیل شد (۱۶). نانوذرات کیتوزان و کربوکسی‌متیل‌نشاسته با استفاده از روش ژلاتین یونی تهیه شدند. رقت‌های مختلف کربوکسی متیل نشاسته (۰/۲۵٪، ۰/۵٪، ۰/۷۵٪ و ۱٪وزنی) با حل کردن پودر کربوکسی‌متیل‌نشاسته در ۱۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه دمای C ۵۰° توسط هم‌زن مغناطیسی (۵۰۰rpm) تهیه شد؛ رقت-های مختلف کیتوزان (۰/۲۵٪، ۰/۵٪، ۰/۷۵ و ۱٪وزنی) با انحلال پودر کیتوزان در ۱۰میلی‌لیتر محلول اسیداستیک ۰/۵٪ (حجمی/حجمی) در دمای اتاق توسط هم‌زن مغناطیسی (۷۰۰rpm) تهیه شد. محلول کیتوزان توسط سدیم هیدروکسید با رقت ۱ مولار تا pH۵ تنظیم شد، ۱۰ میکرولیتر توئین۲۰ به محلول‌ها به‌عنوان عامل امولسیون اضافه شد تا محلول با پراکندگی یکنواخت و بدون تراکم حاصل شود (۱۷).

سنتز گرافن‌اکسید

از روش ارتقا یافتهٔ هامرز برای ساخت گرافن‌اکسید استفاده شد. ابتدا ۱/۵ گرم نیترات‌سدیم و ۳ گرم پودر گرافیت، مخلوط و به آن ۶۹ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک اضافه شد، در حالی که محلول در حمام یخ است ۹ گرم پرمنگنات پتاسیم به آن اضافه و هم‌زده شد، پس از ۲۴ ساعت محلول تشکیل شده با ۴۰۰ میلی‌لیتر آب رقیق شد و ۶ میلی‌لیتر آب اکسیژنه به محلول اضافه شد. به‌منظور احیای اکسیدگرافن، به ۱۰۰ گرم گرافن‌اکسید به‌دست آمده از مرحله قبل، ۱۰۰ میلی‌لیتر آب اضافه شد و با استفاده از التراسونیک به‌صورت تعلیق درآمد. سپس ۲ میلی‌لیتر هیدرات‌هیدرازین به‌عنوان عامل احیا به محلول اضافه شد، و تحت عملیات حرارتی در حمام روغن قرار گرفت. پس از عبور از کاغذ صافی و شستشوی مکرر، رسوب به‌دست آمده را خشک کرده و پودر حاصل جمع-آوری گردید (۱۸).

تهیه سیلیسیوم‌دی‌اکسید

ابتدا ۵ میلی‌لیتر تترا اتیل ارتو سیلیکات (TEOS) به-صورت قطره‌ای به ۱۷۰ میلی‌لیتر محلول اتانول حاوی ۲ میلی‌لیتر محلول ۲۰٪ $NH_3.H_2O$ اضافه شد. پس از ۲۴ ساعت واکنش، سیلیس تولید شده توسط سانتریفیوژ جمع‌آوری و ۵ بار با اتانول مطلق شستشو داده شد و در دمای ۱۰۰°C یک شب خشک شد. سرانجام، نانو سیلیسیوم‌دی‌اکسید به‌دست آمده در دمای ۶۰۰°C به‌مدت ۶ ساعت در کوره کلسینه شد (۱۹).

سنتز نانوکامپوزیت کیتوزان/کربوکسی‌متیل‌نشاسته/گرافن اکسید/سیلیسیوم‌دی‌اکسید

ابتدا ۰/۱۵گرم گرافن‌اکسید به‌دست آمده، در بشر ۲۵۰ میلی‌لیتر حاوی ۳۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه، ۱۶۰ میلی‌لیتر اتانول مطلق، ۵ میلی‌لیتر محلول ۲۵٪ $NH_3 \cdot H_2O$ و ۴ میلی‌لیتر TEOS در حال هم‌زدن، پخش شد. مخلوط حاصل مدت ۱۲ ساعت در دمای اتاق هم‌زده شد. سپس نسبت ۳:۱ از محلول‌های نانوذرات کیتوزان و کربوکسی-متیل‌نشاسته به آرامی و در دستگاه التراسوند (Hilscher UP200H, Germany) تحت سونیکیت مدت ۵۰ دقیقه اضافه شد. چندین بار سوسپانسیون حاصل مدت ۲ دقیقه در ۱۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد، و توسط آب دیونیزه و اتانول شسته شد. نانوکامپوزیت حاصل مدت ۵ دقیقه در نیتروژن مایع ذخیره شد، سپس به دستگاه انجماد خشک انتقال یافت. ارزیابی کیفیت و مورفولوژی نانوکامپوزیت توسط SEM صورت پذیرفت.

تعیین خصوصیات نانوکامپوزیت

تعامل بالقوه بین ترکیبات در سیستم نانوکامپوزیتی و بررسی گروه‌های عاملی توسط FT-IR در دمای اتاق صورت پذیرفت. طیف FT-IR از نانوکامپوزیت ساخته شده بر روی نمونه‌های لیوفیلیزه با استفاده از دستگاه طیف‌سنج ثبت شد. میزان ۱mg از نانوکامپوزیت در هاون همراه با KBr پودر شد و با ضخامت ۰/۱ سانتی‌متر روی صفحه قرار

گرفت. طیف در محدوده Cm^{-1} ۴۰۰-۴۵۰۰ مشاهده شد. ویژگی‌های مورفولوژی سطح نانوکامپوزیت فریزدرای شده با استفاده از SEM با قدرت ۱۰۰ وات بررسی گردید. توزیع اندازه ذرات نانوکامپوزیت توسط زتاسایزر تعیین شد. اندازه‌گیری DLS در یک زاویه پراکندگی ۹۰° بعد از سونیکیت محلول انجام شد (۲۰).

کشت میکروارگانیسم

چند کلنی از رشد یک‌روزه باکتری *استرپتوکوکوس موتانس* در محیط کشت بلاد آگار به ۱۵ میلی‌لیتر محیط کشت مایع BHI منتقل و ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C و rpm ۱۵۰ کشت داده شد؛ سپس ۵۰۰ میکرولیتر از این کشت به ۲۰ میلی‌لیتر محیط BHI تازه اضافه و به شیکرانکوباتور منتقل گردید تا باکتری‌ها در فاز میانی رشد لگاریتمی خود $OD_{۶۰۰}$ (۰/۰-۵/۶) قرار گیرند. مقدار ۱۵ میلی‌لیتر محیط ۱۸ دقیقه در دمای ۴°C و rpm ۴۰۰۰ سانتریفوژ شد تا محیط کشت از سلول‌های باکتری جدا شود (۲۱).

تعیین حداقل غلظت مهارکننده (MIC) نانوکامپوزیت روی باکتری *استرپتوکوکوس موتانس*

جهت تعیین MIC نانوکامپوزیت روی باکتری *موتانس*، کشت ۱۸ساعته باکتری درمحیط کشت BHI دمای ۳۷°C و rpm ۱۵۰ تهیه شد. جذب نوری، $OD_{۶۰۰}$ مادهٔ تلقیح توسط BHI تازه روی ۰/۱ تنظیم گردید. برای تعیین MIC نانوکامپوزیت در پلیت ۹۶ چاهکی، در هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر مادهٔ تلقیح و حجم‌های ۰، ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲، ۶۴، ۱۲۸ میکرولیتر از محلول نانوکامپوزیت (۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) (با سه تکرار) اضافه شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون دردمای ۳۷°C، رشدباکتری‌باثبت $OD_{۶۰۰}$ توسط ELISA اندازه‌گیری شد.MIC نانوکامپوزیت برابر کم‌ترین غلظت است که منجر به $OD_{۶۰۰}$ کم‌تر یا مساوی ۰/۰۵ شود (۲۲).

تعیین اثر نانوکامپوزیت روی تولید بیوفیلم باکتری *استرپتوکوکوس موتانس*

جهت تعیین اثر نانوکامپوزیت روی تولید بیوفیلم باکتری *استرپتوکوکوس موتانس* ابتدا محیط کشت TSB[1] حاوی ۲٪ گلوکز تهیه و استریل شد. جهت تهیه سوسپانسیون باکتری، *استرپتوکوکوس موتانس* در مقداری از همین محیط به کدورت نیم مک فارلند رسانده شد. در انتها در یک پلیت ۹۶ خانه U شکل (کره-SPL) به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری تهیه شده در محیط TSB و یک قطعه از مینای دندان اضافه گردید. پلیت ۲۴ ساعت انکوبه شد. در این روش، ۳چاهک کنترل منفی (عدم رشد باکتری در نتیجه عدم تشکیل بیوفیلم) و ۳ چاهک کنترل مثبت (رشد باکتری و تشکیل بیوفیلم) در یک پلیت باید اختصاص داشته باشد. پس از ۲۴ ساعت، جهت مطالعه بیوفیلم طبق روش رنگ‌آمیزی، ابتدا محیط کشت‌ها از چاهک‌ها حذف گردید و چاهک‌ها و قطعهٔ مینای دندان ۲-۱ بار با بافر PBS سترون با حجم ۲۰۰ میکرولیتر شسته شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از محلول هر نانوکامپوزیت (۱ میلی‌گرم بر میلی لیتر) در حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) در محلول بافر فسفات (pHهای ۵ و ۷) به چاهک‌های مربوطه منتقل شد و مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷°C انکوبه گردید. مرحلهٔ بعد محلول نانوکامپوزیت حذف شد چاهک و مینای دندان ۳ بار با پیپت کردن ۲۰۰ میکرولیتر بافر PBS سترون شستشو داده شد. به‌منظور فیکس‌کردن بیوفیلم، به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر متانول مطلق افزوده شد و ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. پس از ۱۵ دقیقه متانول حذف و چاهک ها در معرض هوا خشک شدند. پس از خشک شدن مینای دندان، به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر کریستال ویوله ۱٪ اضافه و ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. پس از ۵ دقیقه کریستال ویوله حذف گردید و چاهک و مینای دندان ۵ بار با پیپت کردن ۲۰۰ میکرولیتر بافر PBS سترون شستشو داده شد. در آخر به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر اسید استیک v/v ٪۳۳ اضافه شد و پس از ۲۰ دقیقه جذب نوری در ۵۷۰ نانومتر قرائت گردید. برای بررسی نتایج از روش Optical density cut-off (ODc) استفاده شد. به‌منظور بررسی ابتدا انحراف معیار و میانگین OD چاهک‌های کنترل منفی محاسبه سپس طبق فرمول زیر محاسبه انجام شد (۲۳و ۲۴). معادله ۱:

ODc= چاهک‌های کنترل منفی OD میانگین+ (۳× انحراف معیار چاهک‌های کنترل منفی)

بعد از محاسبه ODc یا کات اف، OD چاهک‌های مورد مطالعه طبق موارد زیر دسته‌بندی شد

[1] Tryptic soy broth

بیوفیلم قوی	$OD > 4\times ODc$
بیوفیلم متوسط	$2\times ODc < OD \leq 4\times ODc$
بیوفیلم ضعیف	$ODc < OD \leq 2\times ODc$
بیوفیلم منفی	$OD \leq ODc$

بررسی بیان ژن‌ها به‌روش Real-time PCR

ژن‌هادر باکتری *استرپتوکوکوس موتانس*، ژن اختصاصی گونه بوده و بیان ژن‌های *gtfB, gtfC, gtfD* با واکنش زنجیره-ای پلیمراز RT-PCR بررسی شد. از ژن 16sRNA به‌منظور کنترل داخلی واکنش‌های PCR استفاده گردید. RNA از سلول با روش RNX- PLUS استخراج شد (Invitrogen, Korea). غلظت RNA با روش تعیین دانسیته نوری توسط دستگاه نانودراپ در طول‌موج ۲۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. RNAهای استخراج شده در نمونه‌ها نشان داد نسبت جذب نوری ۲۸۰/۲۶۰ در تمامی نمونه‌های تیمار شده و شاهد بالای ۱.۹۵ با حداقل غلظت ۵۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر بوده و برای ادامه مراحل سنتز cDNA و Real time PCR مناسب هستند. برای ساخت cDNA از پروتکل سازنده کیت bio Fact (bio Fact, Korea) استفاده شد. واکنش qPCR برای تجزیه و تحلیل کمی بیان ژن به روش سایبرگرین با دستگاه Corbett انجام گرفت. جهت انجام واکنش PCR، نمونه‌های cDNA به نسبت ۱ به ۱۰ رقیق شدند. مواد مورد نیاز برای انجام واکنش PCR شامل این موارد است: نمونه‌هایcDNA الگو به میزان ۱µl، DNAase و µ۹.۵l RNA ase free Water ، Taq DNA Polymerase Master ۷µl Mix RED (Amplicon)، Forward Primer وReverse Primer µ۱l استفاده شد. بعد از چند ثانیه ورتکس، برنامه دمائی دستگاه PCR به این ترتیب تنظیم شد. میکروتیوب‌ها: ۵ دقیقه در دمای ℃ ۳۷ ،۳۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ℃۵۰ و ۵ دقیقه در دمای ℃۹۵ در دستگاه ترموسایکلر قرار گرفتند.

طراحی آغازگر با استفاده از برنامه پرایمر ۳ انجام شد. خصوصیات ترمودینامیکی و شکل سه‌بعدی آغازگرها با نرم‌افزار ژن رانر۲ بررسی شد. پرایمرهای طراحی شده برای ژن‌های مورد نظر مطابق جدول ۱ است.

ازای هر نمونه ۷ لاندا مستر میکس استفاده شد. به ازای هر نمونه ۱ میکرولیتر از پرایمر فوروادر و ریورس که معادل ۱۰ پیکومول پرایمر و cDNA به مقدار ۱ µl وارد واکنش شد. ۹.۵ میکرولیتر آب DNAase and RNAase free اضافه گردید . واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵µlشامل مواد

تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط نرم‌افزار $SPSS_{22}$ صورت گرفت. ارزیابی تفاوت گروه‌های مورد آزمایش و شاهد توسط $Graph\ pad\ Prism_{6.01}$ انجام شد. مقایسه تفاوت معنی‌دار بین مقادیر به‌دست آمده از بیان ژن‌های موردنظر در سطح آماری ۰/۰۵توسط آزمون آماری ANOVA ارزیابی شد و مقادیر P<۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

مشخصه‌یابی نانوکامپوزیت

طیف FTIR نانوکامپوزیت کیتوزان/کربوکسی‌متیل نشاسته/ گرافن‌اکسید/سیلیسیوم‌دی‌اکسید

همان‌طورکه در شکل ۱ مشخص است، پیک جذبی در $۳۴۴۲Cm^{-۱}$ حرکات ارتعاشی کششی گروه O–H را نشان می‌دهد. پیک در ناحیه $۱۵۷۳Cm^{-۱}$ به COO و ارتعاش‌خمشی NH (آمید۲) کیتوزان نسبت داده می‌شود. نوار جذبی $۱۴۱۴Cm^{-۱}$ به ارتعاشات خمشی OH-C اختصاص دارد (۲۵). طیف $۱۰۹۳Cm^{-۱}$نشان‌دهنده وجود CMS در نانو کامپوزیت است که به گروه عاملی C–O در C–O–C و C– O–H از مولکول‌های گلیکوزیدیک نسبت داده می‌شود. پیک جذبی در $۶۵۴Cm^{-۱}$ مربوط به ارتعاشات گروه سیلیسیوم دی‌اکسید است.

مورفولوژی نانوکامپوزیت

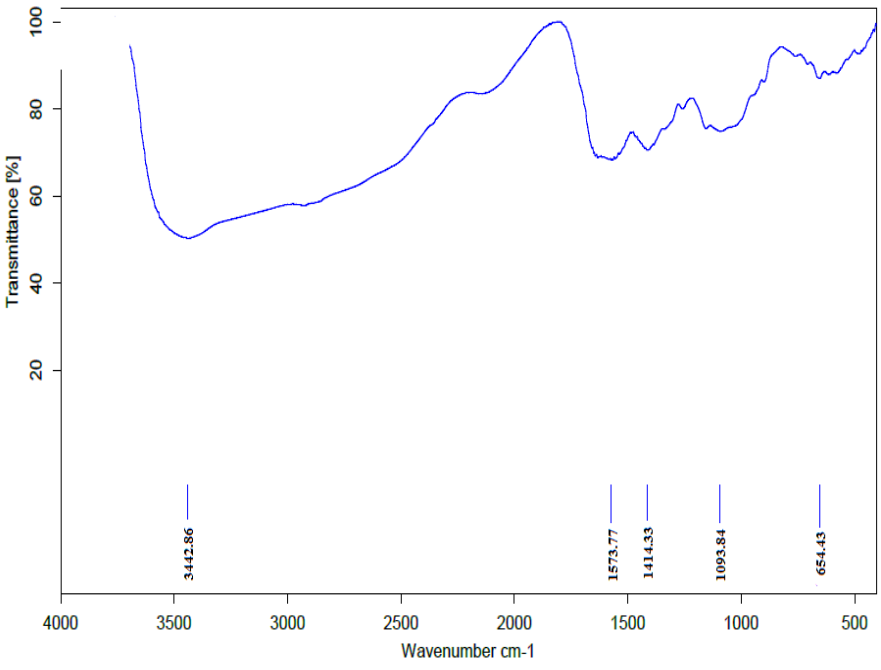
شکل ۲ تصویر SEM نانوکامپوزیت کیتوزان/ کربوکسی متیل‌نشاسته/گرافن‌اکسید/سیلیسیوم‌دی‌اکسید را نشان می دهد. قطر متوسط نانوکامپوزیت در محدوده ۲۱/۱۹ الی ۲۵/۳۳نانومتر به‌دست آمد. با توجه به تصاویرSEM، سطح نانوکامپوزیت همگن به‌نظر می‌رسد، که نشان‌دهنده سازگاری خوب بین کیتوزان، کربوکسی‌متیل‌نشاسته، گرافن‌اکسید و سیلیسیوم‌دی‌اکسید است. اندازه ذرات

[2] Gene runner

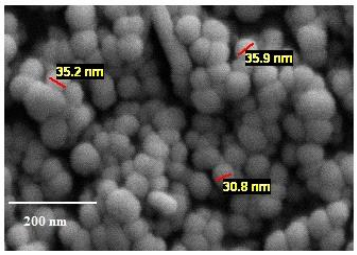
نانوکامپوزیت با استفاده از DLS توسط دستگاه زتاسایزر تعیین شد. مطابق شکل ۳، میانگین اندازه ذرات نانوکامپوزیتکیتوزان/کربوکسی‌متیل‌نشاسته/گرافن‌اکسید/ سیلیسیوم دی‌اکسید حدود ۱۸۲ نانومتر به‌دست آمد

جدول ۱- توالی پرایمرها برای بررسی ژن‌ها در *استرپتوکوکوس موتانس*

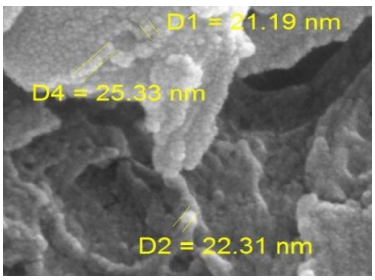
Gene	Sequence (5′→3′)	Product Size (bp)
gtfB	Forward: AGCAATGCAGCCAATCTACAAAT	96
	Reverse: ACGAACTTTGCCGTTATTGTCA	
gtfC	Forward: GGTTTAACGTCAAAATTAGCTGTATTAGC	91
	Reverse: CTCAACCAACCGCCACTGTT	
gtfD	Forward: ACAGCAGACAGCAGCCAAGA	94
	Reverse: ACTGGGTTTGCTGCGTTTG	
16sRNA	Forward: CCTACGGGAGGCAGCAGTAG	101
	Reverse: CAACAGAGCTTTACGATCCGAAA	
recA	Forward: GCGTGCCTTGAAGTTTTATTCTTC	75
	Reverse: TGTTCCCCGGTTCCTTAAATT	



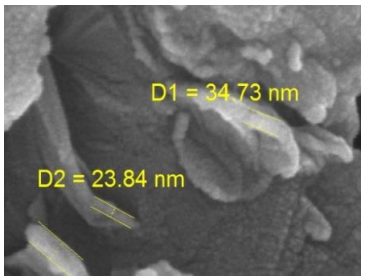
شکل ۱- طیف FTIR نانوکامپوزیت کیتوزان/کربوکسی‌متیل‌نشاسته/گرافن‌اکسید/سیلیسیوم‌دی‌اکسید



(الف)



(ب)



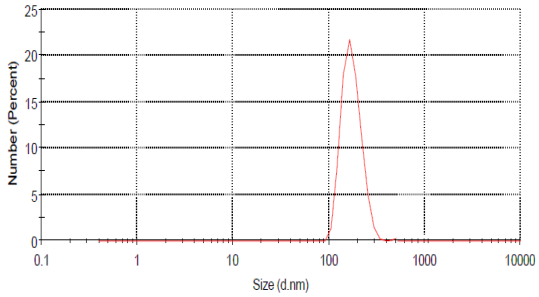
(ج)

شکل۲- تصویر SEM نانوکامپوزیت کیتوزان/ کربوکسی‌متیل‌نشاسته/گرافن‌اکسید/ سیلیسیوم دی‌اکسید

بررسی خاصیت ضدمیکروبی با تعیین حداقل غلظت مهارکننده (MIC) نانوکامپوزیت روی باکتری *استرپتوکوکوس موتانس*

MIC کم‌ترین غلظتی است که در آن نانوکامپوزیت به طور کامل رشد باکتری مورد آزمایش را مهار کند. نتایج حاصل از بررسیMIC نانوکامپوزیت کیتوزان/کربوکسی متیل نشاسته/گرافن‌اکسید/سیلیسیوم‌دی‌اکسید در برابر باکتری بیماری‌زایی مولد پوسیدگی‌دندان۰/۲۰۳میلی‌گرم بر میلی-لیتر به‌دست آمد. جهت محاسبهٔ MIC از فرمول زیر استفاده شد (۲۲)

حجم کل‌محیط/غلظت نانوکامپوزیت×وزن نانوکامپوزیت=MIC



شکل ۳- نمودار DLS نانوکامپوزیت کیتوزان/ کربوکسی‌متیل‌نشاسته/گرافن‌اکسید/سیلیسیوم‌دی‌اکسید

تعیین میزان نانوکامپوزیت روی تولید بیوفیلم باکتری *استرپتوکوکوس موتانس*

با خوانش پلیت توسط الیزا (Biotek-Cytation3-آمریکا) ODهای به‌دست آمده در معادله ۱ قرار داده شد و نتایج حاصل از اثر بازدارندگی نانوکامپوزیت کیتوزان/کربوکسی-متیل‌نشاسته/گرافن‌اکسید/سیلیسیوم‌دی‌اکسید روی میزان تولید بیوفیلم باکتری *استرپتوکوکوس موتانس* روی مدل دندان در جدول ۲ نشان داده شده است. آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شد و جذب‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت گردید.با توجه به نتایج مشاهده گردید اثر بازدارندگی نانوکامپوزیت در غلظت ۴میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد و کم‌ترین مقدار بیوفیلم تشکیل شده در این غلظت نانو کامپوزیت دیده شد (۲۶و۲۷).

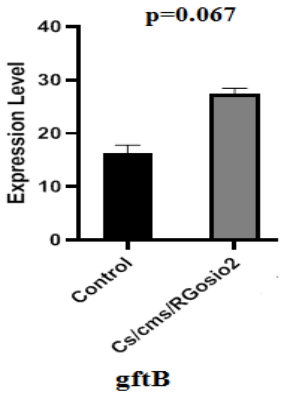
بررسی بیان ژن‌های *gtfB, gtfC, gtfD*

میزان بیان ژن *gtfB* در حضور نانو کامپوزیت کیتوزان/کربوکسی‌متیل‌نشاسته/گرافن‌اکسید/سیلیسیوم‌دی اکسید، نسبت به نمونه کنترل افزایش یافته و نشان‌دهنده اثر منفی نانوکامپوزیت بر سلول‌های تحت درمان است.

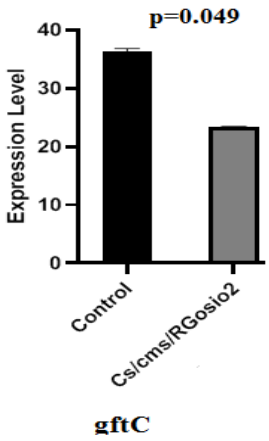
یافته‌های این تحقیق نشان داد ارتباط معناداری در بیان ژن *gftC*، بین گروه تیمار شده نسبت به گروه کنترل مشاهده شد (Pvalue =۰/۰۴۹) (شکل ۴)، که نشان‌دهنده اثر قوی این نانوکامپوزیت در سرکوب ژن *gftC* و کاهش تشکیل بیوفیلم با حداقل تراکم باکتری‌ها داخل بدن است. می‌توان بیان کرد سرکوب ژن‌های *gtf* ممکن است یک روش جایگزین برای مختل شدن فرایند تشکیل بیوفیلم باشد. ارتباط معناداری در بیان ژن‌های *gtfB* و*gtfD*، بین گروه تیمار شده نسبت به گروه کنترل مشاهده نشد (*gtfD*; P= ۰/۱۸۷, *gtfB;* P= ۰/۰۶۷).

جدول ۲- بازدارندگی نانوکامپوزیت

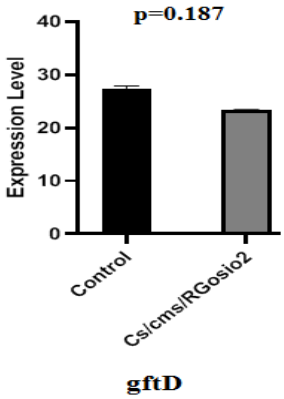
نوع بیوفیلم	غلظت (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	نانوکامپوزیت
منفی	۴	کیتوزان/کربوکسی‌متیل نشاسته/گرافن‌اکسید/ سیلیسیوم‌دی‌اکسید
قوی	۲	
قوی	۱	
قوی	۰/۵	



(الف)



(ب)



(ج)

شکل ۴- بررسی ارتباط معناداری: (الف) ژن *gftB* ، (ب) ژن *gftC* ، (ج) ژن *gftD* در بین سویه‌های *استرپتوکوکوس موتانس* تیمار شده با نانوکامپوزیت

بر اساس تجزیه و تحلیل آماری، از بین ۳ ژن تحت مطالعه، فقط ژن *gftC* میزان بیان ژن را در سلول‌های تحت درمان با نانوکامپوزیت با تفاوت معنی‌داری نشان داد که نشان‌دهنده اثر قوی نانوکامپوزیت در کاهش میزان بیان ژن *gftC* در تشکیل بیوفیلم میکروبی دندان است. در حالی که تیمار با نانوکامپوزیت کیتوزان/کربوکسی‌متیل‌نشاسته/گرافن‌اکسید/سیلیسیوم‌دی‌اکسیدتفاوت معنی‌داری در بیان ژن‌های *gftB* و *gftD* نشان ندادند (P= ۰/۱۸۷, P=۰/۰۶۷).

بحث

به‌طورکلی در مسیر پیشرفت‌های جدید برای شناخت کامل پوسیدگی دندانی و ریشه‌کنی کامل آن، یافتن راهکارهای جدید جهت کاهش پلاک‌های دندانی و عوامل ایجادکننده آن‌ها ضرورت دارد. ثابت شده است عوامل ضدمیکروبی در برابر تشکیل بیوفیلم *استرپتوکوکوس موتانس* راهبردهای کارآمدی هستند. ژن‌های *GTF* در تولید پلیمرهای گلوکان و اتصال باکتری‌ها به سطوح دارای اهمیت زیادی می‌باشند (۲۸). افزایش مقدار بیان آن‌ها در حالت بیوفیلم نسبت به فرم پلانکتونی این موضوع را تایید می‌کند. یوشیدا و همکاران در مطالعه‌ای نشان دادند میزان بیان ژن *gtfB* در حالت بیوفیلم چهار برابر نسبت به حالت پلانکتونیک افزایش می‌یابد (۲۹).

استفاده از فناوری نانو در انتقال دارو به سلول‌ها می‌تواند برخی مشکلات پیشروی رسانش داروهای گیاهی از جمله غیر هدفمند بودن و اکسیدپذیری بالا را تا حدودی برطرف نماید (۳۰).

در این تحقیق، مقدار MIC نانوکامپوزیت کیتوزان/ کربوکسی متیل‌نشاسته/گرافن اکسید/سیلیسیوم‌دی اکسید برابر ۰/۲۰۳ میلی‌گرم‌برمیلی‌لیتر به‌دست آمد.

هم‌چنین حضور کیتوزان در ترکیب سبب بالاتر رفتن اثر ضدمیکروبی کامپوزیت نیز می‌باشد. مکانیزم‌های مختلف از تعامل با باکتری برای کیتوزان ارائه شده است. یک مکانیسم احتمالی می‌تواند تعامل بین مولکول کیتوزان دارای بار مثبت در نانوکامپوزیت و بار منفی غشاء سلول باکتری باشد (۳۱).

کو و همکاران در مطالعه‌ای اثر مهاری Apigenin را روی عدم تشکیل پلاک از طریق مهار ژن‌های *gtf* در سویه *استرپتوکوکوس موتانس UA159* بررسی کردند و نتایج قابل توجهی از مهار ژن‌های *gtfB* و *gtfC* دخیل در سنتز پلی‌ساکارید خارج سلولی گزارش کردند (۳۲). پاسوس و همکاران نیز فعالیت‌های ضدپوسیدگی Libidibia ferrea، گالیک‌اسید و اتیل‌گالات علیه *استرپتوکوکوس‌موتانس* در مدل بیوفیلم را مورد بررسی نمودند. طبق نتایج، اتیل گالات و گالیک‌اسید باعث کاهش گلوکان‌های محلول در قلیایی، سلول‌های زنده و بیان ژن‌های *gtfB*، *gtfC* و *gtfD* در بیوفیلم‌ها شدند (۳۳).

از بین ۳ ژن تحت مطالعه، فقط میزان بیان ژن *gftC* در سلول‌های تیمار شده با نانوکامپوزیت کیتوزان /کربوکسی‌متیل‌نشاسته/گرافن‌اکسید/سیلیسیوم‌دی‌اکسید با تفاوت معنی‌داری نشان داده شد که بیانگر اثر قوی نانوکامپوزیت در کاهش میزان بیان ژن *gftC* در تشکیل بیوفیلم میکروبی دندان است. ارتباط معناداری در بیان ژن‌های *gtfB* و*gtfD*، در سلول‌های تیمار شده با نانو کامپوزیت نسبت به گروه کنترل مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری

در مطالعه اخیر اثر نانوکامپوزیت کیتوزان/کربوکسی متیل‌نشاسته/گرافن‌اکسید/سیلیسیوم‌دی‌اکسید بر بیان ژن های *gtfB*, *gtfC*, *gtfD* /*استرپتوکوکوس موتانس* ارزیابی شد. ابتدا نانوکامپوزیت ساخته شد، سپس مورفولوژی، خصوصیات ساختاری و فعالیت ضدمیکروبی آن بررسی گردید. نتایج بیان ژن نشان داد میزان بیان ژن *gftC* در سلول‌های تیمار شده با نانوکامپوزیت کاهش داشته و این نانوکامپوزیت داری اثر قوی در سرکوب ژن *gtfC* و کاهش تشکیل بیوفیلم میکروبی دندان است.

تقدیر و تشکر

از تمام افرادی که در انجام این تحقیق به ما یاری رسانده اند، کمال تشکر را داریم.

منابع مورد استفاده

1. Denisa, F., Mihai, S., Anton, F., Ecaterina, A., Mehmet, Y., Omer, B.A., 2017. Drug Delivery Systems for Dental Applications. Current Organic Chemistry. 21(1):64-73.
2. Kolenbrander, P.E., Palmer, R.J., Periasamy, S., Jakubovics, N.S., 2011. Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. Nature reviews Microbiology. 8(7):471-480.
3. Irague, R., Tarquis, L., André, I., Moulis, C., Morel, S., Monsan, P., 2013. Combinatorial engineering of dextransucrase specificity. PloS One. 8(10):e77837
4. Biswas, S., Biswas, I., 2005. Role of HtrA in surface protein expression and biofilm formation by Streptococcus mutans. Infection and immunity. 73(10):6923-34.
5. Bowen, W.H., Koo, H., 2011. Biology of *Streptococcus mutans*-Derived Glucosyl transferases: Role in Extracellular Matrix Formation of Cariogenic Biofilms. Caries Research. 45(1):69-86.
6. Koo, H., Rosalen, P.L., Cury, J.A., Park, Y.K., Bowen, W.H., 2002. Effects of compounds found in propolis on Streptococcus mutans growth and on glucosyltransferase activity. Antimicrobial agents and chemotherapy. 46(5):1302-1309.
7. Raut, J.S., Karuppayil, S.M., 2014. A status review on the medicinal properties of essential oils. Industrial Crops and Products. 62:250-264.
8. Othman, A.H., Mehdawi, N., Abu Taha A., Hamed, E.M., Al-Nuri, M.A., Hussein, A.S., 2013. Synthesis and antibacterial activity of novel curcumin derivatives containing heterocyclic moiety. Iranian journal pharmaceutical research : IJPR. 12(1):47-56.
9. Chavez de Paz, L.E., Resin, A., Howard, K.A., Sutherland, D.S., Wejse, P.L., 2011. Anti microbial effect of chitosan nanoparticles on *streptococcus mutans* biofilms. Applied and environmental microbiology. 77(11):3892-3895.
10. Narang, R.S., Narang, J.K., 2015. Nano medicines for dental applications-scope and future perspective. International journal pharmaceutical investigation. 5(3):121-123.
11. Wilpiszewska, K., Antosik, A.K., Spychaj, T., 2015. Novel hydrophilic carboxymethyl starch/montmorillonite nanocomposite films. Carbohydrate polymers. 128:82-89.
12. Nabais, T., Brouillet, F., Kyriacos, S., Mroueh, M., Amores da Silva, P., Bataille, B., 2007. High-amylose carboxymethyl starch matrices for oral sustained drug-release: in vitro and in vivo evaluation. European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics: official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik. eV 65(3): 371-378.
13. Audira, G., Lai, Y.H., Huang, J.Ch., Chen, K.H., Hsiao, Ch.D., 2021. Environ Pollu. 278: 116907.
14. Ye, Y., Liu, J., Xu, J., Sun, L., Chen, M., Lan, M., 2010. Nano-SiO_2 induces apoptosis via activation of p53 and Bax mediated by oxidative stress in human hepatic cell line. Toxicol in Vitro. 24(3):751-758.
15. Won Kim, H., Ahn, E.K., Jee, B.K., Yoon, H.K., Lee, K.H., Lim, Y., 2008. Nanoparticulate-induced toxicity and related mechanism in vitro and in vivo. J Nanopart Res. 11(1):55-65.
16. Saboktakin, M.R., Tabatabaie, R.M., Maharramov, A., Ramazanov, M.A., 2011. Synthesis and in vitro evaluation of carboxymethyl starch–chitosan nanoparticles as drug delivery system to the colon. International j biological macromolecules. 48(3): 381-385.
17. Saikia, C., Hussain, A., Ramteke, A. Sharma, H.K., Maji, T.K., 2015. Carboxymethyl starch chitosan-coated iron oxide magnetic nanoparticles for controlled delivery of isoniazid. J microencapsulation. 32(1):29-39.
18. Pendolino, F., Armata, N., 2017. Graphene Oxide in Environmental Remediation Process.
19. Wang, Y., Zhou, W., Zhang, L., Song, G., Cheng, S., 2015. SiO_2@NiO core–shell nanocomposites as high performance anode materials for lithium-ion batteries. RSC Adv. 5: 63012-63016
20. Noorani, B., Tabandeh, F., Yazdian, F., Soheili, Z.S., Shakibaie, M., Rahmani, S.h., 2018. Thin natural gelatin/chitosan nanofibrous scaffolds for retinal pigment epithelium cells. Int J Polymeric Mater. 67: 754-763.
21. Johanna, J., Leena, N., Lea-Ann, K., Calum, J., Andrew, S., Tim, J., 2007. Identification of a Secreted Cholesterol-Dependent Cytolysin (Mitilysin) from Streptococcus mitis. J Bacteriolo. 2: 627-632.
22. Telma, B., Louis, G., Denise, P., Daniel, G., 2014. Subinhibitory Concentrations of Triclosan Promote Streptococcus mutans Biofilm Formation and Adherence to Oral Epithelial Cells. PLoS ONE. 9:1-6.
23. Stepanovic, S., Vukovic, D., Dakic, I., Savic, B., Svabic-Vlahovic, M., 2000. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. Journal Microbiology Methods. 40:175-179.
24. Park, B.S., Kim, J.G., Kim, M.R., Lee, S.E., Takeoka, G.R., Oh, K.B., 2005. Curcuma longa L. constituents inhibit sortase A and Staphylococcus aureus cell adhesion to

fibronectin. J Agricultural and Food Chemistry. 53:9005-9009.
25. Abdollahi, S., Pourahmad, A., 2018. Synthesis and Characterization of Graphene - ZnO NPs Nanocomposite and Its Application for Antibacterial Activities. J Fasa University of Medical Sciences. 8(2):805-814.
26. Telma, B., Louis, G., Denise, P., Daniel, G., 2014. Subinhibitory Concentrations of Triclosan Promote Streptococcus mutans Biofilm Formation and Adherence to Oral Epithelial Cells. PLoS ONE 9: 1–6.
27. Stepanovic, S., Vukovic, D., Dakic, I., Savic, B., Svabic-Vlahovic, M., 2000. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. Journal Microbiology Methods 40: 175–179.
28. Yue, J., Yang, H., Liu, S., Song, F., Guo, J., Huang, C., 2018. J Dentistry. 76:24-31. doi.org/10.1016/j.jdent.2018.04.013.
29. Yoshida, A., Kuramitsu, H., 2002. *Streptococcus mutans* biofilm formation: utilization of a gtfB promoter-green fluorescent protein (PgtfB: gfp) construct to monitor development. Microbiology. 148(Pt 1):3385-3394.
30. Stojiljkovic, J., Trajchev, M., Nakov, D., Petrovska, M., 2018. Antibacterial activities of rosemary essential oils and their components against pathogenic bacteria, Adv Cytol Pathol. 3(4):93-96.
31. Beighton, D., 2005. The complex oral microflora of high-risk individuals and groups and its role in the caries process. Community dentistry and oral epidemiology. 33(4):248-255.
32. Koo, H., Seils, J., Abranches, J., Burne, R.A., Bowen, W.H., Quivey, R.G., 2006. Influence of apigenin on gtf gene expression in Streptococcus mutans UA159. Antimicrobial agents and chemotherapy. 50(2):542-546.
33. Passos, M.R, Almeida, R., Oliveira Lima, B., Rodrigues, J.Z., deMacêdo Neres, N., 2021. J Ethnopharmacol. 274:114059.