



T.C.  
YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
RESTORATİF DİŞ TEDAVİSİ ANA BİLİM DALI

**RESTORATİF MATERYALLERİN YÜZEYLERİNDE *S. MUTANS*'İN  
BİYOFİLM OLUŞTURMASI VE PROBİYOTİK LAKTİK ASİT  
BAKTERİSİNİN BİYOFİLM ÜZERİNE ETKİNLİĞİNİN İN VİTRO  
OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ**

DOKTORA TEZİ

DİŞ HEKİMİ

ALP KAYAHAN KIVANÇ

İSTANBUL 2018



T.C.  
YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
RESTORATİF DİŞ TEDAVİSİ ANA BİLİM DALI

**RESTORATİF MATERYALLERİN YÜZEYLERİNDE *S. MUTANS*'İN  
BİYOFİLM OLUŞTURMASI VE PROBİYOTİK LAKTİK ASİT  
BAKTERİSİNİN BİYOFİLM ÜZERİNE ETKİNLİĞİNİN İN VİTRO  
OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ**

DOKTORA TEZİ

DİŞ HEKİMİ

ALP KAYAHAN KIVANÇ

DANIŞMAN

DOÇ. DR. HAKTAN YURDAGÜVEN

İSTANBUL 2018

## TEZ ONAYI FORMU

Kurum : Yeditepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü



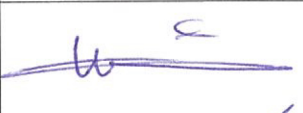
Program : Restoratif Diş Tedavisi

Tez Başlığı : Restoratif materyallerin yüzeylerinde *S. mutans*'in biyofilm oluşturması ve Probiyotik Laktik Asit bakterisinin biyofilm üzerine etkinliğinin *in vitro* olarak değerlendirilmesi

Tez Sahibi : Alp Kayahan KIVANÇ

Sınav Tarihi : 11.06.2018

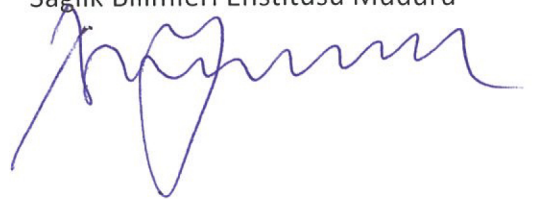
Bu çalışma jürimiz tarafından kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

	Unvanı, Adı-Soyadı (Kurumu)	İmza
Jüri Başkanı:	Prof.Dr.Asım Mubin SOYMAN Yeditepe Üniversitesi	
Tez danışmanı:	Doç.Dr.Haktan YURDAGÜVEN Yeditepe Üniversitesi	
Üye:	Prof.Dr.Ender KAZAZOĞLU Yeditepe Üniversitesi	
Üye:	Prof.Dr.Nilgün SEVEN Atatürk Üniversitesi	
Üye:	Prof.Dr.Yavuz GÖMEÇ İstanbul Üniversitesi	

### ONAY

Bu tez Yeditepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun ..12../06../2018.. tarih ve ..2018/10-102.....sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Bayram YILMAZ  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü



## BEYAN

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

11.05.2018

Alp Kayahan Kıvanç

## TEŞEKKÜR

Doktora tezi çalışmalarımın konu seçiminde, çalışma sürecimin tüm aşamalarında, değerli tecrübeleriyle bana yol gösteren, çok hassas ve titiz değerlendirmeleriyle beni yönlendiren sayın tez hocam Doç.Dr.Haktan Yurdağüven`e

Öğrenciliğimin ilk günlerinden beni her konudaki yol göstericiliği, ilgi ve desteği; tez aşamamda da bilimsel ve manevi destekleriyle çalışmama ivme kazandıran anabilim dalı başkanı sayın Prof.Dr.Asım Mubin Soyman`a

Fakülteye başladığımız ilk günden beri gerek sevecen ve ilgili yaklaşımlarıyla ve gerekse dekanlığı dönemindeki ilgi ve alakalarıyla desteğini esirgemeyen dekanımız sayın Prof.Dr.Ender Kazazoğlu`na

Anabilim dalındaki; üzerimde eşsiz tecrübeleriyle ve katkılarıyla emeği geçen tüm değerli hocalarım Prof.Dr.Esra Can Eroğlu, Doç.Dr.Kağan Gökçe ve Dr.Öğretim üyesi Mustafa Ersoy`a ve bölümdeki tüm değerli çalışma arkadaşlarıma

Hem sevgi ve şefkat dolu hem de bilimsel çalışmalarıyla çalışmama katkı sunan ve laboratuvar çalışmalarımın yürütülüp değerlendirilmesinde büyük desteği olan sevgili annem Prof.Dr.Merih Kıvanç`a ve yine tüm yaşam boyunca sevgi, destek ve moral takviyesini esirgemeyen sevgili babam psikiyatr Dr.Hasan Ulvi Kıvanç`a ve tez çalışmamın istatistik çalışmaların büyük bir titizlikle yapılmasında desteği olan ağabeyim Doç.Dr.Sertaç Argun Kıvanç` a

Tez çalışmalarımda katkı sunan sevgili teyzem Prof.Dr.Zuhal Kırzioğlu` na

Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Mikrobiyoloji laboratuvarında çalışan öğrenci arkadaşlarıma

Teşekkür eder saygı ve minnetlerimi arz ederim.

## İÇİNDEKİLER

BEYAN .....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
RESİM LİSTESİ.....	viii
ŞEKİL LİSTESİ.....	xi
TABLO LİSTESİ .....	xiii
KISALTMALAR.....	xv
ÖZET.....	xvii
ABSTRACT.....	xx
1) GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
2) GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Restoratif Materyaller ve Özellikleri .....	3
2.1.1. Kompozit Resinler.....	3
2.1.1.1. Kompozit Resinlerin Yapısı .....	3
2.1.1.2. Kompozit Resinlerin Sınıflandırılması .....	5
2.1.1.3. Farklı Özellikteki Kompozit Resinler.....	10
2.1.2. Cam İyonomer Simanlar.....	11
2.1.2.1. Cam İyonomerler Simanların Tipleri .....	11
2.1.2.2. Restoratif Cam İyonomer Simanlar.....	12
2.1.3. Dental Cad/Cam Sistemlerinde Kullanılan Seramikler.....	12
2.1.3.1. Resin Nano Seramikler.....	13
2.1.3.2. Lityum Silikatla Güçlendirilmiş Cam Seramikler .....	13
2.2. Oral Kavitenin Mikrobiyal Yapısı.....	14

2.3. Biyofilm .....	16
2.3.1. Oral Biyofilm.....	18
2.3.2. Restoratif Materyallerde Biyofilm Oluşumu ve Etkili Faktörler .....	21
2.3.3. Diş Çürüğüne Neden Olan Mikroorganizmalar.....	22
2.3.4. Plağın Çürük Oluşumundaki Rolü.....	24
2.4. Probiyotiklerin Diş Sağlığı Üzerine Etkileri.....	26
2.4.1. Probiyotiklerin Diş çürüğüne Etkisi .....	28
2.4.2. Probiyotiklerin Diş Plağına etkisi .....	30
3) MATERYAL VE YÖNTEM.....	32
3.1. Çalışmada Kullanılan Materyaller .....	32
3.1.1. Hidroksiapatit örneklerin hazırlanması .....	34
3.1.2. Kompozit rezin örneklerin hazırlanması .....	34
3.1.3. Cam iyonomer örneklerin hazırlanması.....	37
3.1.3. CAD/CAM bloklarda örneklerin hazırlanması.....	39
3.2. Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmalar.....	42
3.3. Tükürük Hazırlanması.....	42
3.4. Çalışmada Kullanılan Besi Yerleri ve Kimyasallar .....	43
3.5. Seçilen İzolatların Morfolojik ve Biyokimyasal Özelliklerine Göre Tanımlanması .....	47
3.5.1. Gram Boyama.....	47
3.5.2. Katalaz testi.....	48
3.5.3. Oksidaz testi.....	48
3.5.4. Hemolitik Aktivite Tayini .....	48
3.5.5. Test İzolatlarının API CHL 50 ve API Strep 20 ile Karbonhidratları Kullanma Durumlarının Belirlenmesi .....	48
3.6. Seçilen İzolatlarının 16S rRNA Dizi Analizi İle Genotipik Karakterizasyonlarının Belirlenmesi.....	49
3.7. İzolatların Biyofilm Oluşturma Özelliklerinin Belirlenmesi.....	51
3.7.1. Kongo Kırmızılı Ortamda Biyofilm Oluşumunun Belirlenmesi.....	51
3.7.2. Mikrotitre Plaka Yöntemi ile Test Mikroorganizmalarının Biyofilm Oluşumunun Belirlenmesi.....	51
3.8. Seçilen İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi.....	53

3.9 Antibakteriyel Aktivite Tayini.....	53
3.10. Restoratif Materyallerde <i>S.mutans</i> 1`in Biyofilm Oluşturması ve <i>L.rhamnosus</i> 12`nin Biyofilm Oluşumu Üzerine Etkisinin Belirlenmesi.....	54
3.10.1. Restoratif Materyallerde Biyofilm Oluşturan Canlı Koloni Sayısının Belirlenmesi.....	58
3.10.2. Biyofilm Oluşumunun Spektrofotometre ile Değerlendirilmesi.....	59
3.10.3. SEM için Örneklerin Hazırlanması ve Görüntü Alınması.....	61
3.11. İstatistik Analizleri .....	61
4) BULGULAR.....	62
4.1. Test Bakterilerinin Tanımlanması .....	62
4.2. İzolatların Biyofilm Oluşturma Özelliklerinin Belirlenmesi.....	65
4.3. Seçilen İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi .....	67
4.4. Antibakteriyel Aktivite Tayini.....	70
4.5. Restoratif Materyallerde <i>S.mutans</i> 1`in Biyofilm Oluşturması ve <i>L.rhamnosus</i> 12`nin Biyofilm Oluşumu Üzerine Etkisinin Belirlenmesi.....	72
4.5.1. Restoratif Materyallerde <i>S.mutans</i> 1`in ve <i>L.rhamnosus</i> 12`nin Biyofilm Oluşturması .....	72
4.5.2. Restoratif Materyallerde <i>S.mutans</i> 1`in Biyofilm Oluşturması Üzerine <i>L.rhamnosus</i> 12`nin etkisinin Belirlenmesi .....	75
5) TARTIşMA.....	109
6) SONUÇ .....	125
7) KAYNAKLAR .....	127
8) ÖZGEÇMİş.....	149



## RESİM LİSTESİ

<b>Resim 3.1.</b> Hidroksiapatit .....	34
<b>Resim 3.2.</b> GC G-aenial A1 .....	35
<b>Resim 3.3.</b> Kurarary Clearfil majesity ES 2 A1 .....	35
<b>Resim 3.4.</b> Shofu Beautiful II A1 .....	35
<b>Resim 3.5.</b> Bisco AElite purpose all body A1 .....	35
<b>Resim 3.6.</b> Sonic Fill 2 A1 .....	35
<b>Resim 3.7.</b> Politetrafloroetilen kalıp ( teflon) .....	35
<b>Resim 3.8.</b> Işık aleti.....	36
<b>Resim 3.9.</b> Etüv .....	36
<b>Resim 3.10.</b> Zımpara cilası .....	37
<b>Resim 3.11.</b> Zımparalar .....	37
<b>Resim 3.12.</b> Cila patı ( Monocrystalline Diamond Suspension) .....	37
<b>Resim 3.13.</b> Keçe .....	37
<b>Resim 3.14.</b> Equia Forte A2 .....	38
<b>Resim 3.15.</b> Equia Forte Coat .....	38
<b>Resim 3.16.</b> Karıştırıcı .....	38
<b>Resim 3.17.</b> Kapsül tabancası .....	38
<b>Resim 3.18.</b> Emax bloklar .....	39
<b>Resim 3.19.</b> Lava bloklar .....	40
<b>Resim 3.20.</b> Cerec 4 .....	40
<b>Resim 3.21.</b> Kesit alma cihazı .....	40
<b>Resim 3.22.</b> Programat PS10 cihazında emax örneklerin sinterize edilme öncesi ve sonrası .....	41
<b>Resim 3.23.</b> Yüzey profilometresi .....	41
<b>Resim 3.24.</b> CRA plaklarına ekim ve görüntü .....	51
<b>Resim 3.25.</b> Spektrofotometre (Shimadzu, UV-2101PC) .....	52
<b>Resim 3.26.</b> 96 kuyucuklu mikrotitrasyon plakaları biyofilm oluşumlarının belirlenmesi .....	52

<b>Resim 3.27.</b> Hazırlanan disklerin steril tükürük içine yerleştirilmesi .....	55
<b>Resim 3.28.</b> Restoratif materyallerden hazırlanan diskler tükürük içinden çıkarıldıktan sonra.....	56
<b>Resim 3.29.</b> Disklerin yıkanması .....	56
<b>Resim 3.30.</b> Disklerin çok kuyucuklu polistren plakalara yerleştirilmesi .....	56
<b>Resim 3.31.</b> <i>S.mutans</i> 1 ve <i>L.rhamnosus</i> 12 içeren disklerin ve besiyerlerinin dağılışı .....	57
<b>Resim 3.32.</b> <i>S.mutans</i> 1 ve <i>L.rhamnosus</i> 12 birlikte içeren disklerin ve besiyerlerinin dağılışı .....	57
<b>Resim 3.33.</b> Filtre yerleştirilmiş ve filtre olmayan kuyucukların yukarıdan görünüşü .....	58
<b>Resim 3.34.</b> Disk örneklerinin PBS ile 3 kez yıkandıktan sonra tüplere alınması .....	58
<b>Resim 3.35.</b> Ependorflarda seri dilüsyonun hazırlanması ve damla ekim işlemi .....	59
<b>Resim 3.36.</b> Disklerden kristal viyole ile boyanan biyofilmin kaldırılması ve çok Kuyucuklu plakalara yerleştirilmesi .....	60
<b>Resim 4.1.</b> API CHL 50 paneli ile biyokimyasal testlerin uygulanması .....	63
<b>Resim 4.2</b> Api Strep 20 kiti ile biyokimyasal testlerin uygulanması .....	64
<b>Resim 4.3.</b> CRA plaklarında biyofilm oluşumu .....	65
<b>Resim 4.4.</b> CRA plaklarında Streptokok suşlarında biyofilm oluşumu .....	65
<b>Resim 4.5.</b> Mikrotitrasyon plağı .....	66
<b>Resim 4.6.</b> Streptokoklarda antibiyogram .....	70
<b>Resim 4.7.</b> Damlatma yöntemi ile <i>L.rhamnosus</i> suşlarının antibakteriyal aktivitesinin belirlenmesi .....	70
<b>Resim 4.8.</b> Kuyucuk yöntemi ile antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi .....	71
<b>Resim 4.9.</b> <i>S. mutans</i> 1 sayım plağı basitrasin Mitis salivarius agarda .....	75
<b>Resim 4.10.</b> <i>L.rhamnosus</i> 'un sayım plağı MRS agar üzerinde .....	75
<b>Resim 4.11.</b> Hidroksiapatit diskler üzerinde biyofilm oluşumuna <i>L. rhamnosus</i> 12' nin etkisinin SEM görüntüleri .....	79
<b>Resim 4.12.</b> Beautiful II (shofu) diskler üzerinde biyofilm oluşumuna <i>L.rhamnosus</i> 12' nin etkisinin SEM görüntüleri .....	83

<b>Resim 4.13.</b> Clearfil Majesty ES 2 diskler üzerinde biyofilm oluşumuna <i>L.rhamnosus</i> 12' nin etkisinin SEM görüntüleri.....	87
<b>Resim 4.14.</b> Sonic fill 2 diskler üzerinde biyofilm oluşumuna <i>L.rhamnosus</i> 12' nin etkisinin SEM görüntüleri .....	90
<b>Resim 4.15.</b> G-ænial diskler üzerinde biyofilm oluşumuna <i>L.rhamnosus</i> 12' nin etkisinin SEM görüntüleri .....	94
<b>Resim 4.16.</b> Ælite all purpose body diskler üzerinde biyofilm oluşumuna <i>L.rhamnosus</i> 12' nin Etkisinin SEM görüntüleri.....	98
<b>Resim 4.17.</b> Equia forte diskler üzerinde biyofilm oluşumuna <i>L.rhamnosus</i> 12' nin etkisinin SEM görüntüleri .....	102
<b>Resim 4.18.</b> Emax diskler üzerinde biyofilm oluşumuna <i>L.rhamnosus</i> 12' nin etkisinin SEM görüntüleri.....	105
<b>Resim 4.19.</b> Lava diskler üzerinde biyofilm oluşumuna <i>L.rhamnosus</i> 12' nin etkisinin SEM görüntüleri.....	108

## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1. Karyojenik biyofilm oluşumu .....	21
Şekil 2.2. Sükrozun metabolizması .....	24
Şekil 2.3. Restorasyon yapılmış dişlerde çürük oluşumu .....	25
Şekil 2.4. Oral probiyotiklerin potansiyel etkileri .....	28
Şekil 4.1. Laktik asit bakterilerinin farklı şeker içeren ortamlarda biyofilm oluşturma durumları .....	67
Şekil 4.2. Streptokok izolatlarının ve <i>E.faecium</i> suşlarının çeşitli karbon kaynaklarını içeren ortamlarda biyofilm oluşturma durumları.....	69
Şekil 4.3. Hidroksiapatit ve restoratif materyallerde <i>S. mutans</i> 1 ve <i>L.rhamnosus</i> 12` nin biyofilm oluşumu .....	73
Şekil 4.4. Hidroksiapatit ve restoratif materyallerde <i>S. mutans</i> 1 ve <i>L.rhamnosus</i> 12 sayısı .....	74
Şekil 4.5. Hidroksi apatit disklerde <i>S. mutans</i> 1 in biyofilm oluşturmaya üzerine <i>L.rhamnosus</i> 12`nin etkisi .....	76
Şekil 4.6. Hidroksiapatit diskler üzerinde biyofilm oluşturan canlı bakteri sayıları ( $\log_{10}$ kob /mL) .....	77
Şekil 4.7. Beautiful II (shofu) disklerde <i>S. mutans</i> 1` in biyofilm oluşturmaya üzerine <i>L.rhamnosus</i> 12`nin etkisi .....	80
Şekil 4.8. Beautiful II (shofu) diskler üzerinde biyofilm oluşturan canlı bakteri sayıları ( $\log_{10}$ kob /mL).....	80
Şekil 4.9. Clearfil Majesty ES 2 disklerde <i>S.mutans</i> 1` in biyofilm oluşturmaya üzerine <i>L.rhamnosus</i> 12` nin etkisi .....	84
Şekil 4.10. Clearfil Majesty ES 2 diskler üzerinde biyofilm oluşturan canlı bakteri sayıları ( $\log_{10}$ kob /mL).....	85
Şekil 4.11. Sonic fill 2 disklerde <i>S.mutans</i> 1` in biyofilm oluşturmaya üzerine <i>L.rhamnosus</i> 12` nin etkisi.....	88

<b>Şekil 4.12.</b> Sonic fill 2 diskler üzerinde biyofilm oluşturan canlı bakteri sayıları ( $\log_{10}$ kob /mL) .....	88
<b>Şekil 4.13.</b> G-ænial disklerde <i>S.mutans</i> 1` in biyofilm oluşturmaya üzerine <i>L.rhamnosus</i> 12` nin etkisi .....	91
<b>Şekil 4.14.</b> G-ænial diskler üzerinde biyofilm oluşturan canlı bakteri sayıları ( $\log_{10}$ kob /mL) .....	91
<b>Şekil 4.15.</b> Ælite all purpose body disklerde <i>S. mutans</i> 1` in biyofilm oluşturmaya üzerine <i>L.rhamnosus</i> 12` nin etkisi .....	95
<b>Şekil 4.16.</b> Ælite all purpose body diskler üzerinde biyofilm oluşturan canlı bakteri sayıları ( $\log_{10}$ kob /mL) .....	95
<b>Şekil 4.17.</b> Equia Forte disklerde <i>S. mutans</i> 1` in biyofilm oluşturmaya üzerine <i>L.rhamnosus</i> 12` nin etkisi .....	99
<b>Şekil 4.18.</b> Equia Forte diskler üzerinde biyofilm oluşturan canlı bakteri sayıları ( $\log_{10}$ kob /mL) .....	99
<b>Şekil 4.19.</b> Emax disklerde <i>S. mutans</i> 1` in biyofilm oluşturmaya üzerine <i>L.rhamnosus</i> 12` nin etkisi .....	103
<b>Şekil 4.20.</b> Emax diskler üzerinde biyofilm oluşturan canlı bakteri sayıları ( $\log_{10}$ kob /mL) .....	103
<b>Şekil 4.21.</b> Lava disklerde <i>S. mutans</i> 1` in biyofilm oluşturmaya üzerine <i>L.rhamnosus</i> 12` nin etkisi .....	106
<b>Şekil 4.22.</b> Lava diskler üzerinde biyofilm oluşturan canlı bakteri sayıları ( $\log_{10}$ kob /mL) .....	106

## TABLO LİSTESİ

<b>Tablo 2.1.</b> Probiyotik olarak kullanılan bakteriler .....	27
<b>Tablo 2.2.</b> Probiyotikler ve uygulama örnekleri .....	29
<b>Tablo 3.1.</b> Kompozit rezinler içerikleri ve üretici firmaları.....	32
<b>Tablo 3.2</b> Cam iyonomer siman içerikleri ve üretici firmaları .....	33
<b>Tablo 3.3</b> CAD/CAM bloklar içerikleri ve üretici firmaları .....	33
<b>Tablo 3.4.</b> Hidroksiapatit içerikleri ve üretici firmaları .....	33
<b>Tablo 3.5.</b> Alkol serilerin için gerekli alkol ve distile su miktarları .....	46
<b>Tablo 3.6.</b> Tez çalışmasında alkol serilerinin dehidratasyon işleminde kullanım oranları ve süreleri .....	61
<b>Tablo 4.1.</b> Test bakterilerinin bazı özellikleri .....	63
<b>Tablo 4.2.</b> Test bakterilerinin 16S rRNA dizi analizi ile genotipik karakterizasyon sonuçları .....	64
<b>Tablo 4.3.</b> CRA plaklarında izolatların biyofilm oluşturma durumu.....	66
<b>Tablo 4.4.</b> Streptokokların antibiyotik hassasiyeti.....	68
<b>Tablo 4.5.</b> Laktik asit bakterilerinin antibiyotik hassasiyeti .....	68
<b>Tablo 4.6.</b> <i>L.rhamnosus</i> suşlarının antibakteriyal aktivitesi ( zon çapı mm) .....	71
<b>Tablo 4.7.</b> Restoratif materyallerin uygulamadan önce ölçülen Ra değerleri.....	73
<b>Tablo 4.8.</b> Hidroksiapatitin uygulamadan önce ve uygulamadan sonraki pürüzlülük değerleri (Ra) .....	78
<b>Tablo 4.9.</b> Hidroksiapatitte uygulamalardan sonra elde edilen son pH değerleri.....	78
<b>Tablo 4.10.</b> Beautiful II 'nin uygulamadan önce ve uygulamadan sonraki pürüzlülük değerleri (Ra) .....	82
<b>Tablo 4.11.</b> Beautiful II materyalinde uygulamalardan sonra elde edilen son pH değerleri .....	82
<b>Tablo 4.12.</b> Clearfil Majesty ES 2'nin uygulamadan önce ve uygulamadan sonraki pürüzlülük değerleri (Ra) .....	86
<b>Tablo 4.13.</b> Clearfil Majesty ES 2 materyalinde uygulamalardan sonra elde edilen son pH değerleri .....	86

<b>Tablo 4.14.</b> Sonic fill 2 materyalinde uygulamadan önce ve uygulamadan sonraki pürüzlülük değerleri (Ra) .....	89
<b>Tablo 4.15.</b> Sonic fill 2 materyalinde uygulamalardan sonra elde edilen son pH değerleri .....	89
<b>Tablo 4.16.</b> G-ænial materyalinde uygulamadan önce ve uygulamadan sonraki pürüzlülük değerleri (Ra) .....	93
<b>Tablo 4.17.</b> G-ænial materyalinde uygulamalardan sonra elde edilen son pH değerleri .....	93
<b>Tablo 4.18.</b> Ælite all purpose body materyalinde uygulamadan önce ve uygulamadan sonraki pürüzlülük değerleri (Ra) .....	97
<b>Tablo 4.19.</b> Ælite all purpose body materyalinde uygulamalardan sonra elde edilen son pH değerleri .....	97
<b>Tablo 4.20.</b> Equia forte materyelinde uygulamadan önce ve uygulamadan sonraki pürüzlülük değerleri (Ra) .....	101
<b>Tablo 4.21.</b> Equia forte materyalinde uygulamalardan sonra elde edilen son pH değerleri .....	101
<b>Tablo 4.22.</b> Emax materyalinde uygulamadan önce ve uygulamadan sonraki pürüzlülük değerleri (Ra) .....	104
<b>Tablo 4.23.</b> Emax materyalinde uygulamalardan sonra elde edilen son pH değerleri .....	104
<b>Tablo 4.24.</b> Lava materyalinde uygulamadan önce ve uygulamadan sonraki pürüzlülük değerleri (Ra) .....	107
<b>Tablo 4.25.</b> Lava materyalinde uygulamalardan sonra elde edilen son pH değerleri .....	107

## KISALTMALAR ve SİMGELER

AHL	Açıl homoserin lakton
AIP	Autoinducer peptidler
AL-2	Autoinducer-2
Bis-GMA	Bisfenol-A-glisidil metakrilat
Bis-EMA	Etoksilatlı bisfenol A glikol dimetakrilat
BHI	Brain heart infusion
CİS	Cam iyonomer siman
CRA	Kongo kırmızısı agar
°C	Derece Celcius
DNA	Deoksiribonükleik asit. Genetik bilgiyi taşıyan nükleik asit
DOS	Dişi eti oluğu sıvısı
EPS	Ekzopolisakkarit
FTS	Fizyolojik tuzlu su
FTF	Fruktoziltransferaz
g	Santrifüj kuvveti, gravite
GTF	Glukoziltransferaz
kob	koloni oluşturan birim
LAB	Laktik asit bakterisi
Lr	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> 12
mm	Milimetre
mL	Mililitre
MRS	Lactobacillus Agar acc. DE MAN, ROGOSA and SHARPE Agar
µm	Mikron, mikrometre



nm	Nanometre
OD	Spektrofotometrede seçilen dalga boyunda okuma değeri
QS	Çoğunluğu algılama
PBS	Fosfat tamponlu su
Ra	Yüzey pürüzlülüğü
Sm	<i>Streptococcus mutans</i> 1
TEGDMA	Trietilen Glikol Dimetakrilat
UDMA	Üretan Dimetakrilat

## ÖZET

**Kivanc, AK. (2018). Restoratif materyallerin yüzeylerinde *S. mutans* biyofilm oluşturması ve Probiyotik Laktik Asit bakterisinin biyofilm üzerine etkinliğinin *in vitro* olarak değerlendirilmesi**

**Yeditepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Restoratif Diş Tedavisi Anabilim Dalı, Doktora Tezi, İstanbul.**

Kompozit rezinler, cam iyonmer simanlar ve seramik malzemeler restoratif diş hekimliğinde hem estetik özellikleri hem de doldurucu özellikleri nedeniyle dişlerin restorasyonunda sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak yapılan restorasyonların bir kısmının zaman içinde yenilenmesi gerekmektedir. Bu ise hem zaman kaybına hem de ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Bu restorasyonların değiştirilmesine sebep olan başarısızlıkların en önemli sebeplerinden biri sekonder çürüklerdir. Sekonder çürüklerin nedeni kenar sızıntısı, ağız hijyeni uygulamalarının eksik veya yanlış yapılması sonucu bakteri plağı oluşumudur.

Çürüklerin oluşumuna sebep olan dental plak polisakkarit bir matriks içinde çok sayıda bakteriyi barındıran bir biyofilmdir. Bakteriyal adezyon kuvveti ve agregasyonla bakteriyal veya tükürük proteinleri ile ilişkili olup lipidler ve nükleik asitlerde bu yapı da yer alabilir. *S. mutans*, asidojenik özelliği ile diş sert dokusuna zarar verir. Sükroz varlığında suda çözünmeyen glukanlar sentezleyerek diş yüzeyinde kolonize olarak dental plağın oluşmasına neden olur. Restorasyonun altında ve etrafında çürük oluşmasına neden olur.

Oral bakteriler tarafından oluşturulan biyofilmi önlemek için çeşitli tedavi ve yöntem başvurulmaktadır. En çok uygulanan yöntemlerden bazıları çeşitli kimyasal maddelerin ve antibiyotiklerin kullanılmasıdır. Son yıllarda laktik asit üreten bakterilerinin etkin olabileceği belirlendikten sonra probiyotik bakterilere ilgi artmıştır. Probiyotikler canlı mikroorganizmalar olup konakçının sağlığına yararlı etkileri bulunmaktadır.

Restoratif materyallerin yüzeyinde *S.mutans*'ın biyofilm oluşumu ve biyofilmin probiyotik bakterilerle önlenmesi ile ilgili az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu nedenle çalışmamızda güncel restorasyon malzemelerin yüzeyinde (G-ænial (GC), Clearfil Majesty ES 2 (Kuraray), Ælite all purpose body (Bisco), Beautiful II (Shofu), Sonic fill 2 (Kerr),Equia Forte (GC), Emax (ivoclar) ve Lava (3M Espe) ) *S. mutans* 1' in biyofilm

oluşumu ve bir probiyotik bakteri olan *L. rhamnosus* 12' nin biyofilm oluşumu üzerine etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Restoratif materyallerden hazırlanan diskler üzerinde *S.mutans* 1'in biyofilm oluşturması diskler tükürükle kaplandıktan sonra invitro koşullarda % 2 sükroz içeren Brain heart infusion broth içinde 24 saat 37°C de inkübe edilerek beklenmiştir. Oluşan biyofilm kristal viyole ile boyandıktan sonra glasiyel asetik asit ile kaldırılarak spektrofotometrede 570 nm dalga boyunda okunarak değerlendirilmiştir. Ayrıca disklerdeki biyofilm içindeki canlı bakteri sayımı da damlatma plak yöntemi ile belirlenmiştir. *L.rhamnosus* 12'nin biyofilm üzerine etkisini belirlemede ise iki yol izlenmiştir. Birinci uygulamada *S.mutans* 1 ve *L.rhamnosus* 12 birlikte, ikinci uygulamada ise *L.rhamnosus* 12 filtre içine konularak yapılmıştır. Her iki uygulamada da biyofilm oluşumu spektrofotometre ile belirlenmiş ve biyofilmdeki bakteri sayımları yapılmıştır. Her uygulamada son pH belirlenmiştir.

*S.mutans* 1 en yüksek biyofilmi G-ænial ve Ælite purpose body ve Majesty ES 2 , en düşük biyofilmi ise Beatiful II oluşturmuştur. Canlı bakteri sayımı ise en yüksek  $8,37 \pm 0,41 \log \text{ cfu/mL}$  olarak Equia forte' de saptanmıştır. Bunu Beatiful II ( $7,80 \pm 0,61 \log \text{ cfu/mL}$  ) ve G-ænial ( $7,88 \pm 0,70 \log \text{ cfu/mL}$  takip etmiştir. En düşük sayımlar ise Emax ( $5,50 \pm 0,70 \log \text{ cfu/mL}$  ) ve Lava'da ( $4,45 \pm 0,24 \log \text{ cfu/mL}$  ) olmuştur.

*L.rhamnosus* 12 sükroz içeren ortamda restoratif materyallerde düşük biyofilm oluşturmuştur. En yüksek biyofilm oluşumu kurarayda olurken en düşük biyofilm ise hidroksiapatit, Emax ve Lava'da belirlenmiştir. En yüksek bakteri sayısı Equia forte ( $7,51 \pm 0,19 \log \text{ cfu/mL}$ ) ve Beatiful II ( $7,30 \pm 0,57 \log \text{ cfu/mL}$ ) de saptanmıştır. En düşük sayım ise Emax ( $2,37 \pm 0,50 \log \text{ cfu/mL}$ ) da belirlenmiştir.

Yapılan annova analizinde *S.mutans* 1'in ve *L.rhamnosus*12 'nin biyofilm oluşturması açısından restoratif materyaller arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık olduğu ( $p < 0.05$ ) belirlenmiştir.

*L. rhamnosus* 12' nin biyofilm oluşumuna etkisine bakılacak olursa, *S. mutans* 1 ile birlikte uygulandığında hidroksiapatit dışında diğer restoratif materyallerde değişen oranlarda biyofilm oluşumunu azaltmıştır. Bu farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $p < 0.05$ ). *L. rhamnosus* 12' nin filtre içine uygulandığı işlemde ise bütün restoratif materyallerde biyofilm oluşumu önemli ölçüde azalmıştır.

*S.mutans* 1 sayımları gerek birlikte uygulamada ve gerekse *L.rhamnosus* 12' nin filtre içine uygulandığı işlemlerde düşük olarak saptanmıştır.

Biyofilm oluşumu restoratif materyallere göre değişiklik göstermiştir. *L.rhamnosus* 12 restoratif materyallerde ve diş yapısına benzer bir yapı gösteren hidroksiapatitte biyofilm

oluşumunu etkilemiştir. Bu etki istatistiksel ( $p<0.05$ ) olarak önemli bulunmuştur. SEM görüntüleri ile de bu durum doğrulanmıştır. Seçtiğimiz *L.rhamnosus* 12` nin etkili bir suş olduğu görülmektedir. *S.mutans* 1` in biyofilm oluşumunu önemli ölçüde azaltmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Restoratif materyal, biyofilm, probiyotik, *S.mutans*, laktik asit bakterileri, *L.rhamnosus*.



## ABSTRACT

**Kivanc, AK. (2018). Biofilm formation of *Streptococcus mutans* on restorative material surfaces and in vitro assessment of efficacy of probiotic lactic acid bacteria on biofilm**

**Institute of Medical Sciences of Yeditepe University, Department of Restorative Dentistry, PhD dissertation, Istanbul**

Composite resins, glass ionomers and ceramic materials are frequently used in the restoration of teeth because of both their aesthetic properties and filling properties in the restorative dentistry. However, some of the restorations should be renewed over time. This causes both time loss and economic losses. One of the most important reasons for the failures that cause these restoration changes are the secondary decays. The cause of the secondary decays is the formation of bacterial plaque, which is the result of edge leakage or incorrect oral hygiene practices.

The dental plaque that causes the formation of decays is a biofilm that contains a large number of bacteria in a polysaccharide matrix. Bacterial adhesion is associated with bacterial or salivary proteins with force and aggregation, which can also occur in lipids and nucleic acids. *S. mutans* damages the hard tissue of the tooth with its acidogenic properties. In the presence of sucrose, it synthesizes water-insoluble glucans and causes colonization of the tooth surface resulting in dendritic plaque formation. It causes decays under and around the restoration.

Various treatments and methods are applied to prevent the biofilms caused by the oral bacteria. Some of the most common methods are the use of various chemical substances and antibiotics. Interest in probiotic bacteria has increased since it has been proven in recent years that lactic acid producing bacteria may be effective. Probiotics are living microorganisms and have beneficial effects on the health of the host.

There are few studies on the formation of biofilms of *S.mutans* on the surface of restorative materials and the prevention of biofilm with probiotic bacteria. For this reason, in our study, we aimed to determine the biofilm formation of *S.mutans* 1 and the effect of *L.rhamnosus* 12, a probiotic bacteria, on biofilm formation on the surface of current

restorative materials (G-aenial (GC), Clearfil Majesty ES 2 (Kuraray), Aelite all-purpose body (Bisco), Beautiful II (Shofu), Sonic fill 2 (Kerr), Equia Forte (GC), Emax (Ivoclar) and Lava (3M Espe).

The formation of biofilm by the *S. mutans* 1 on the discs prepared from restorative materials discs were kept for 24 hours at 37 ° C in a brain heart infusion broth containing 2% sucrose after covering them with saliva. The resulting biofilm was stained with crystal violet, then removed with glacial acetic acid and read and evaluated at 570 nm wavelength on the spectrophotometer. Furthermore, viable bacterial counts in the biofilm in the discs were also determined by the drip plaque method. In determining the effect of *L.rhamnosus* 12 on biofilm, two methods were used. In the first method, *S. mutans* 1 and *L. rhamnosus* 12 were combined together and in the second method, *L. rhamnosus* 12 was placed in the filter. In both methods, the biofilm formation was determined by spectrophotometer and bacterial counts were made in the biofilm. The final pH was determined in each method.

*S.mutans* 1 formed the highest biofilm in G-aenial and Aelite al purpose body and Majesty ES 2, and the lowest biofilm in Beatiful II. The count of live bacteria was found to be the highest of  $8,37 \pm 0,41$  log cfu / mL in Equia forte. This was followed by beatiful II ( $7,80 \pm 0,61$  log cfu / mL) and G-aenial ( $7,88 \pm 0,70$  log cfu / mL). The lowest counts were detected in Emax ( $5,50 \pm 0,70$  log cfu / and in the Lava ( $4,45 \pm 0,24$  log cfu / mL).

*L. rhamnosus* 12 produced low biofilm in restorative materials in medium containing sucrose. The highest biofilm formation was in the reserve while the lowest biofilm was found in the hydroxyapatite, Emax and Lava. The highest bacterial counts were in the Equia forte ( $7,51 \pm 0,19$  log cfu / mL) and Beatiful II ( $7,30 \pm 0,57$  log cfu / mL). The lowest count was also in Emax ( $2,37 \pm 0,50$  log cfu / mL).

Annova analysis showed that there was a statistically significant difference ( $p < 0.05$ ) between the restorative materials in terms of biofilm formation of *S. mutans* 1 and *L. rhamnosus* 12.

As far as the effect of *L. rhamnosus* 12 on biofilm formation is concerned, it reduced biofilm formation at varying rates in other restorative materials except hydroxyapatite when applied together with *S. mutans* 1. This difference was statistically significant ( $p < 0.05$ ). In the process of applying *L. rhamnosus* 12 into the filter, the formation of biofilm in all restorative materials decreased considerably.

It was found that *S.mutans* 1 counts were low both in co-practice and when the *L.rhamnosus* 12 was applied within the filter.

The formation of biofilm varied according to the restorative materials. *L.rhamnosus* 12 affected the formation of hydroxyapatite biofilm in restorative materials and in hydroxyapatite that had in a structure similar to dental structure. This effect was statistically significant ( $p < 0.05$ ). SEM images also confirmed it. The *L.rhamnosus* that we have chosen seems to be an effective strain. It significantly reduced biofilm formation of *S.mutans*.

**Key Words :** Restorative material, biofilm, probiotic, *S.mutans*, lactic acid bacteria, *L.rhamnosus*.



## 1.GİRİŞ ve AMAÇ

Kompozit rezinler, cam iyonmer simanlar ve seramik materyaller hem estetik özellikleri hem de fiziksel özellikleri nedeniyle restoratif dişhekimliğinde sıklıkla kullanılmaktadır (1). Restorasyon kaybı, diş ve dişeti sağlığının bozulmasına sebep olan sekonder çürüklerin, halen problem olduğu çalışmalarda ortaya koyulmuştur (2, 3). Günümüzde antimikrobiyal özellikli restoratif materyaller üretilse de bakteriler kenar sızıntısı, diş yüzeyine ve restorasyona tutunan plak oluşumuna ve daha sonra sekonder çürüklerin oluşmasına neden olmaktadır (4,5,6). Yapılan birçok klinik çalışmada da sekonder çürüklerin restorasyonlardaki başarısızlığının nedeni olduğu gösterilmiştir (7,8). Seramik malzemelerle ilgili olarak yeterli bilgi bulunmamaktadır. Ancak bu malzemelerde doğal diş yüzeyine göre daha ince plak oluşmasına karşın canlılığın daha yüksek olduğu saptanmıştır (9,10). Restorasyonun yapıldığı bölgelerde karyojenik biyofilm oluşumu varlığında sekonder çürükler gelişmektedir. Bakteriyel kolonizasyonunda restoratif materyalin yüzey özelliği önemli bir rol oynamaktadır. Restoratif materyal üzerindeki biyofilm oluşumu, hem materyale zarar verir hem de buna paralel olarak yüzeyi pürüzlendirir (11). Bu sırada kolonize olan bakteriler restorasyonun yüzeyine ve restorasyon ile diş arasındaki ara yüze yerleşirler (12) ve dişeti enflamasyonu ile sekonder çürüklere neden olurlar (13).

Oral kavitede yaklaşık 700 bakteri türü bulunmaktadır (14). Oral bakteriler insanlarda başlıca en yaygın iki hastalıktan sorumludurlar. Bunlardan biri diş çürüğü diğeri ise periodontal hastalıklardır (15). Diş çürüklerine neden olan en önemli bakteri *Streptococcus mutans*' tır (16). *S. mutans*' in doğal habitatı ağız olup diş yüzeylerinde oluşan dental plakta bulunmaktadır. Dental plak polisakkarit bir matriks içinde çok sayıda bakteriyi barındıran bir biyofilmdir. Biyofilm, bakteriyel adezyon kuvveti ve agregasyonla ilişkili olduğu kadar bakteriyel veya tükürük proteinleri ile de ilişkili olup lipidler ve nükleik asitler de bu yapıda yer alabilir (16). *S. mutans*, asidojenik özelliği ile diş sert dokusuna zarar verir. Düşük pH'da canlılığını sürdürebildiği için ortamda bulunan diğer bakteriler ile rekabet eder. Sükroz varlığında suda çözünmeyen glukanlar sentezler. Böylece diş yüzeyine yapışarak kolonize olarak dental plağın oluşmasına neden olur (17). Restorasyonun altında ve etrafında çürük oluşmasına neden olur (18).



Oral bakteriler tarafından oluşturulan biyofilmi önlemek için çeşitli önlemlere başvurulmaktadır. En çok uygulanan yöntemlerden biri ise çeşitli kimyasal maddelerin kullanılmasıdır. Antibiyotikler, alkoller, klorheksidin, lizozim, laktoperoksidaz gibi enzimler, uçucu yağlar, floridler, metal iyonları, bitki ekstraktları, fenoller kuarterner amonyum bileşikleri bu amaçla kullanılmaktadır (19, 20). Son yıllarda doğal ürünlere yönelik ve yapılan çalışmalarda laktik asit bakterilerinin etkin olabileceği belirlendikten sonra probiyotik bakterilere ilgi artmıştır.

Probiyotikler canlı mikroorganizmalar olup konakçının sağlığına yararlı etkileri bulunmaktadır (21). Laktik asit bakterilerinin birçok üyesi probiyotik olarak tanımlanmıştır. Son yıllarda oral hastalıkların kontrolü ve önlenmesinde probiyotiklerle tedavi ilgi çekmeye başlamıştır. Bu uygulamaya bakteriyoterapi adı verilmektedir. Bu konuda birçok çalışma yapılmasına karşın hala bu konudaki çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

Literatürde çeşitli restoratif materyaller üzerinde biyofilm oluşumu ve önlenmesine ait çalışmalar oldukça sınırlıdır. Özellikle yeni nesil restoratif materyallerde bu konuda bilgi yok denecek kadar azdır. Restoratif materyallerde biyofilm oluşumu ve önlenmesi sekonder çürüklerin önlenmesinde büyük önem taşımaktadır.

Bu çalışmada yeni nesil restoratif materyallerin yüzeyinde (G-aenial (GC), Clearfil Majesty ES 2 (Kuraray), Aelite all purpose body (Bisco), Beautiful II (Shofu), Sonic fill 2 (Kerr), Equia Forte (GC), Emax (Ivoclar)ve Lava (3M Espe) ) *S. mutans* 1'in biyofilm oluşturması incelenerek, probiyotik bir bakteri *L. rhamnosus* 12'nin biyofilm oluşumu üzerine etkisinin olup olmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Restoratif Materyaller ve Özellikleri

Modern restoratif diş hekimliğinde, doğru tanı ve en uygun tedavi yöntemi ile diş doku kaybının restorasyonu ile dişin fonksiyonel özelliklerinin ve estetik görünümü kazandırılması amaçlanmaktadır. Restorasyonun ömrü hekimin bilgi ve yeteneğine, seçilen tedavi yöntemine, restoratif materyallerin fiziksel özellikleri ve yüzey kalitesine, hastanın oral hijyenine ve kötü alışkanlıklarına bağlıdır (22, 23).

#### 2.1.1. Kompozit Rezinler

Diş hekimliğinde kullanılan mine ve dentin dokusuna adeziv sistemler ile bağlanan kompozit rezinler ilk defa 1962 yılında Rafael Bowen tarafından geliştirilmiştir (24 ).

Kompozit kelimesi, terminolojik olarak materyallerin fiziksel bir karışımı anlamına gelmektedir (22, 23, 25, 26). Kompozit ; organik bir matriks içerisine belli oranlarda eklenen inorganik doldurucular ve doldurucuların organik matrikse tutunmasını sağlayan bağlayıcıdan oluşan dolgu maddeleridir (27). Bir başka tanımı ise kimyasal olarak birbirinden farklı en az 2 maddenin birbiri içerisinde çözünmeden oluşan 3 boyutlu kombinasyonudur (28).

##### 2.1.1.1. Kompozit rezinlerin yapısı

Kompozit rezinler 3 ayrı fazdan oluşur ( 22, 28, 29)

- Organik faz
- İnorganik faz
- Ara faz (Silan)

#### **2.1.1.1.A. Organik Faz**

Kompozit rezinlerin en büyük kısmını oluşturur. Organik fazın polimerizasyonu ile materyal sertleşir (22, 30, 31).

Kompozit rezinlerde en çok kullanılan monomerler bisfenol A ile glisidil metakrilatın (glycidyl methacrylate) birleşmesi sonucu oluşan bisglisidil metakrilattır (BİS-GMA-bisglycidyl methacrylate) (23). Bazı sistemlerde, kompozit rezinlerin daha iyi adezyon olması için ve renk değişimine karşı daha dirençli hale getirmek için Bis-GMA yerine üretan dimetakrilat (UDMA-urethane dimethacrylate) kullanılmıştır (32). Hem BİS-GMA hem de UDMA yüksek visköz olduğundan başka bir monomer olan trietilen glikol dimetakrilat (TEGDMA, triethylene glycol dimethacrylate) viskoziteyi azaltmak için matrikse ilave edilmiştir (23, 29, 30, 32-36).

#### **2.1.1.1.B. İnorganik Faz**

Organik faz arasında bulunan çeşitli şekil ve büyüklükteki kuartz, koloidal silika, barosilikat cam, lityum alüminyum silikat, stronsiyum, baryum, çinko , yitrium cam, baryum alüminyum silikat, zirkonyum oksit gibi inorganik doldurucu partiküllerden oluşmaktadır (37, 22). Bu doldurucu partiküller kompozit rezinlere farklı özellikler kazandırır. Baryum, çinko, stronsiyum zirkonyum oksit, aliminyum oksit ve yitrium kompozit rezinin radyoopak olmasını sağlar. Silika partikülleri karışımın mekanik özelliklerini güçlendirir ve ışığı geçirip yaymasını sağlar. Böylece kompozit rezine yarı şeffaf bir görüntü kazandırarak mineye benzer görünüm kazanır. Bunun yanında kompozit rezinlerin aşınmaya karşı direncini artırırken ısısal genleşme katsayısı ve polimerizasyon büzülmesini azaltır (22, 23, 37).

Kristalin formunda doldurucu partiküller kompozit rezine sertlik özellik kazandırırken kompozit rezinin bitirme ve polisaj işlemini zorlaştırır. Bu nedenle nonkristalin formunda silikalar kullanılmaktadır (22).

#### **2.1.1.1.C. Ara Faz (Silan)**

Hidrojenli organik silisyum birleşimi olan silan, organik ile inorganik faz arasında sıkı bir bağlantı oluşturarak restoratif materyallerinin fiziksel ve kimyasal yapılarının

sürekliliğini sağlamaktadır. Ara faz, rezin matris ve doldurucular arasında bağlanma streslerinin paylaşılmasını gerçekleştirdiği için doldurucu partiküllerin kompozitlerin yüzeylerinden kopmasını engellemektedir (22).

Günümüzde kullanılan kompozit rezinlerde bulunan silika partiküllerin yüzeyi kompozit rezinin fiziksel ve mekanik özelliklerini geliştirmek için silan ajanı ile önceden kaplanmıştır. Bu sayede kompozit rezinin çözünürlüğünü ve su emilimini azalmaktadır. Çift fonksiyonlu moleküller olan silanlar bir ucu silika partiküllerin yüzeyinde bulunan hidroksil grupları ile bağ oluştururken diğer ucu organik matrisde bulunan metakrilat grupları ile bağlar kurmaktadır. Kompozit rezinlerde "3-metakriloksipropil trimetoksisilan" reaktif olup en çok kullanılan bir bağlayıcı ajandır (22, 26, 29, 34-39).

### **2.1.1.2. Kompozit Rezinlerin Sınıflandırılması**

Kompozit rezinler inorganik doldurucu partiküllerin büyüklüğüne, polimerizasyon yöntemlerine ve viskozitelerine göre sınıflandırılmaktadır. Bu sınıflandırmalar arasında günümüzde en geçerli olanı inorganik doldurucu partiküllerin büyüklüğüne göre yapılan sınıflandırmadır (24, 26, 32, 35).

#### **2.1.1.2.A. İnorganik Doldurucu Partiküllerin Büyüklüğüne Göre Kompozit Rezinler**

İnorganik doldurucu partiküllerin ağırlık ve hacim olarak yüzdesi doldurucu partikül büyüklüğü ile ilgilidir.

- 50-100 µm arasında: megafil kompozitler
- 10-50 µm arasında: makrofil kompozitler
- 1-10 µm arasında: midifil kompozitler
- 0,1-1 µm arasında: minifil kompozitler
- 0,01-0,1 µm arasında mikrofil kompozitler
- 0,01 µm veya daha küçük nanofil (nanodoldurucu) kompozitler adlandırılmaktadır.

İlave olarak, farklı büyüklükteki doldurucu partiküllerin karışımını içeren kompozitlere de hibrit kompozit denilmektedir.

### **Megafil Kompozit Rezinler**

Kompozit rezinlerde inorganik doldurucu partiküllerin büyüklüğü 50-100 mikrometredir ( $\mu\text{m}$ ). Oklüzalde temas yüzeylerinde yada fazla aşınan bölgelerde uygulanması önerilmektedir ( 22, 36).

### **Makrofil Kompozit Rezinler**

İnorganik doldurucu partiküllerin büyüklüğü 10-50  $\mu\text{m}$  olan kompozitlere denir. Bu tür kompozitlerde inorganik doldurucular olarak kuartz partikülleri içermiştir. Kırılma dirençleri yüksektir fakat bu doldurucu partiküllerin büyük ve sert olması, organik matrisin inorganik partiküllerden daha fazla aşınmasına yol açarak yüzey pürüzlülüğüne ve renklenmesine sebep olur (22, 36, 40).

### **Midifil Kompozit Rezinler**

İnorganik doldurucu partiküllerin büyüklüğü 1-10  $\mu\text{m}$  olan kompozitler rezinlerdir (22).

### **Minifil Kompozit Rezinler**

0.1-1 $\mu\text{m}$  büyüklüğünde olan inorganik doldurucu partiküllerdir. Doldurucu partiküllerin miktarı ve sayısı makrofil türdeki kompozitlere göre daha fazla olması makrofil kompozitlere göre daha düzgün yüzey elde edilmesi sağlanmaktadır (22, 36).

### **Mikrofil Kompozit Rezinler**

İnorganik doldurucu partiküllerin büyüklüğü 0.01-0.1  $\mu\text{m}$  arasındadır. Bu tür kompozitlerin sıkışma dayanıklılıkları iyidir ancak diğer fiziksel ve mekanik özellikleri makrofil kompozitlere göre zayıftır. Partikül miktarı makrofil kompozitlerden daha az olduğundan monomer oranı fazladır. Bu nedenle su absorpsiyonu ve ısıl genişleme katsayısı artarken elastisite modülünü azalmıştır ( 22, 36). Submikron kompozit rezinlerin Ortalama

partikül büyüklüğü 0,2 µm dir. Partikül büyüklüğü 0,1-0,3 arasında değişen materyaller submikron kompozit olarak isimlendirilir (40,41).

### **Nanofil Kompozit Rezinler**

Son yıllarda diş hekimliğindeki gelişmelerden olan nanoteknoloji ile nanofil kompozit rezinlerin inorganik doldurucu partiküllerin büyüklüğü 0.005-0.01 µm arasındadır.

Nanodoldurucu partiküllerin diğer tipteki inorganik doldurucu partiküllerden küçük olmaları, organik yapı ile temas eden yüzey alanının artması ve inorganik faz-organik faz bağlantısının daha kuvvetli olmasını sağlamaktadır ( 42).

Bu tipteki doldurucu partiküller görünür ışık dalga boyundan (0.02-2 µm) daha küçüktür ve bundan dolayı ışık ile absorpsiyon veya saçılım gibi etkileşimlere girmezler. Doldurucu partiküller görülemeyecek kadar küçük olduklarından çeşitli polimer zincirleri arasına uyumlu bir şekilde yerleşebilirler. Bundan dolayı da doldurucu oranının artırılması ile polimerizasyon büzülmesi azaltılması sağlanmaktadır (22, 25, 43,44, 45). Bunun yanında partiküllerin görünür ışığın dalga boyunun kırılması sonucunda fark edilemeyecek boyutlarda olduğu için kompozit rezinlerin optik özelliklerini arttırmaktadır (46). Bu tür kompozitler mikrofil kompozitler kadar iyi cilalanabilirliği özelliğini gösterirken hibrit kompozit rezinler kadar fiziksel özelliği ve aşınma direnci yüksektir ( 42, 47).

### **Hibrit Kompozit Rezinler**

Farklı büyüklükteki inorganik doldurucu partiküllerin biraraya gelmesiyle oluşan kompozitlerdir. Bu tip doldurucu partiküllerin büyüklüğü makrofil kompozitlerdeki partiküllerden daha küçük iken miktar olarak mikrofil kompozitlerde içeren partiküllerden fazladır (22, 36). Mekanik ve fiziksel bakımından makrofil kompozit rezinler ile benzer özellikler gösterirken yüzey pürüzlülüğü yönüyle ise mikrofil kompozit rezinlere benzemektedir. Kompozit rezinlerin içeriğinde bulunan büyük doldurucu partiküller hibrit türünü belirler, küçük doldurucu partiküller ise karışımın ikinci bileşenidir (23). Günümüzde 0.04 µm büyüklüğünde inorganik partiküllerin 0.1 µm – 1 µm büyüklüğünde partiküllerle birleşiminin sonucunda oluşan mikrohibrit kompozit rezinler geneksel hibrit kompozit rezinlerden daha kolay uygulanabilme ve daha iyi cilalanabilme özellikleri ile ayrılmaktadır (48). Hibrit ve Mikrohibrit kompozit rezinlerin aşınma direnci yüksek

olmasına rağmen cilalarını kaybedip zamanla pürüzlülüğü artabilir (40).

Bununla birlikte mikrohibrit kompozit rezinler mikrofil kompozit rezinlere göre daha iyi fiziksel özelliklerine sahip iken cilalanabilirlik bakımından üstün değildirler (49). Son yıllarda mikrohibritten sonra cilalanabilme özelliklerini geliştirmek ve aşınma direncini arttırmak için 0.005-0.01 µm büyüklüğünde inorganik doldurucu partiküller içeren nanohibrit kompozit rezinler geliştirilmiştir.

#### **2.1.1.2.B. Polimerizasyon Yöntemlerine Göre Kompozit Resinler**

- Kimyasal olarak polimerize olan kompozitler
- Işık ile polimerize olan kompozitler
- Hem kimyasal hem de ışık ile polimerize olan kompozitler

#### **Kimyasal Olarak Polimerize Olan Kompozit Resinler**

İki patın ya da pat ile likit karıştırılıp kimyasal yolla sertleşerek meydana gelen kompozit resinlerdir. Bu tür kompozit resinlerde, polimerizasyonu başlatan benzoil peroksit ile polimerizasyonu hızlandıran tersiyer amin bulunmaktadır. Amin, benzoil peroksit ile reaksiyona girerek polimerizasyonu başlatmaktadır. Bu yolla polimerize olan kompozitlerde tersiyeramin içerdiği için ağızda kimyasal değişikliğe uğrayarak amin renklenmesi oluşabilmektedir. Partikülleri büyük ve BİS-GMA miktarı fazla olan kompozitlerde daha fazla renkleşme olurken küçük partiküller içeren ışıkla polimerize olan kompozitlerde daha az renkleşme görünmektedir (22, 50, 51).

#### **Işık İle Polimerize Olan Kompozit Resinler**

1972 yılında polimerizasyon ultraviyole ışığı ile kullanılmaya başlanmış ancak hekim ve hasta için zararlı olabileceğinden ve ultraviyole ışığının penetrasyon derinliği yeterli olmadığından ultraviyole ışığın yerine görünür ışık kullanımı tercih edilmeye başlanmıştır. Polimerizasyonu başlatılmasını sağlayan görünür mavi ışık ortalama 420-470 nm (nanometre) dalga boyundadır. Bu tür kompozitler tek pat halinde olup içeriğinde ışık emici olan kamforokinon ve hızlandırıcı olan alifatik amin bulunmaktadır. (22, 37, 51). Kamfonokinon dışında kompozit resinlerin yapısına fosfinoksid bazlı, bisilfosfin oksit

(BAP) ve tria ilfosfin oksit (TPO) gibi polimerizasyon başlatıcılar da kompozit eklenebilmektedirler (24).

### **Hem Kimyasal Hem Işık ile Polimerize Olan Kompozitler Rezinler (Dual Cure Kompozitler)**

Bu tür kompozit rezinlerde işık aktivatörleri ve kimyasal katalizörleri bulunmaktadır. Polimerizasyon işık ile başlatılıp kimyasal olarak devam ederek tamamlanmaktadır ( 22, 32).

#### **2.1.1.2.C. Viskozitlerine Göre Kompozit Rezinler**

Monomer viskozitesi, doldurucu partikül miktarı ve doldurucu partiküllerin büyüklüğü kompozit rezinlerin viskozitesini belirler (22).

- Kondanse olabilen kompozitler ( Packable composites)
- Akışkan kompozitler ( Flowable composites)

#### **Kondanse Olabilen Kompozitler**

İnorganik doldurucu partikül miktarı konvansiyonel ve hibrit kompozitlere göre daha fazla oranda olup kondanse edilebilen kompozitlerdir. Bu tür kompozitlerde inorganik doldurucu partiküller hibrit kompozitlere göre daha büyük boyutlarda olduğundan bitirme ve polisaj işlemleri sırasında p r zli yüzey oluşma riski fazladır. Ancak kontakt noktalarının oluşturulması ve kaviteye basınç uygulanarak kolay yerleştirilmesi açısından tercih edilebilmektedir (22, 32, 52 ).

#### **Akışkan Kompozitler**

Kondanse olabilen kompozitler ve d şuk viskoziteli kompozitlere göre daha akıcı olan hibrit kompozit rezinlerdir. İnorganik doldurucu partikül miktarı az olduğundan aşınmaya karşı dirençleri zayıftır. Fakat kavite duvarlarına adaptasyonu çok iyidir (22).



### **2.1.1.3. Farklı Özellikteki Kompozit Rezinler**

#### **2.1.1.3.A. İyon Salabilen Kompozitler**

Bakteri üremesini inhibe etmek amacıyla üretilen bu tür kompozitlerde yapılan restorasyonun yüzeyinde pH değerinin değişimlerine bağlı olarak florür, hidroksil ve kalsiyum iyonları salmaktadır. Plak birikimi artıkça pH değeri düşeceğinden iyon salınımı artmaktadır. Karyojenik bakterilerden oluşan asitlerin tamponlanacağı, demineralizasyonun ve sekonder çürüklerin oluşumunun önlenmesi amacıyla kullanılmaktadır (22).

#### **2.1.1.3.B. Bulkfill Kompozitler**

Nanohibrit kompozit türü olup tabakalama tekniğine göre daha hızlı bir yöntem olan bulk tekniğiyle doldurmak amacıyla geliştirilen kompozitlerdir (53,54,55). Bu türdeki kompozit rezinlerin konvansiyonel, hibrit ve akışkan kompozitlere göre daha az polimerizasyon büzülmesine sahiptirler (56).

Zaman kaybı, hava kabarcıklarının oluşum riski ve tabakalar arasında kontaminasyon oluşumu gibi problemlerin önüne geçebilmek için üretilen bulkfill kompozitler 4-5 mm kalınlığında yerleştirilebilmektedir ( 57- 60 ).

Akışkan restoratif bulkfill kompozitlerde inorganik doldurucu partiküllerin oranları genelde konvansiyonel kompozit rezinlere göre daha düşük iken boyutları daha büyüktür. Bu tür kompozitlerde polimerizasyon başlatıcı olan kamforokinon dışında ıvocerin adında germanyum bazlı başlatıcı ilave edilerek ışığı daha iyi absorbe etmesini sağlamaktadır ( 61, 62).

Restoratif bulkfill kompozitlerin pürüzsüz ve krem kıvamındaki yapısıyla kavite kenar uyumu çok iyi sağlanmaktadır ve düşük polimerizasyon büzülmesiyle mikrosızıntı ve sekonder çürük olasılığı azaltmaktadır (63).

### **2.1.2. Cam İyonomer Simanlar**

Cam iyonomer simanlar (CİS) ilk defa 1972`de Wilson ve Kent tarafından ASPA ( alumino silicate polycarylic acid ) adı altında üretilmiştir (64). Toz – likit karıştırılması ile oluşan cam iyonomer simanlar silikat simanla polikarboksilat simanın hibritidir (65).

CİS, toz kısmı olan bazik floro-alumino silikat cam tanecikleri ile likit kısmı olan poliakrilik asit, akrilik-itakonik asit ve akrilik-maleik asit kopolimerlerinin karışımından oluşmaktadır. Toz ayrı zamanda florür, kalsiyum fosfat ve sodyum içermektedir (66).

CİS`nin en büyük avantajlardan biri flor salınıdır. Dolayısıyla sekonder çürük oluşumunu azalttığı bildirilmektedir (67,68). CİS içeriğinde bulunan florid matriksin yapısında olmadığı için CİS`nin fiziksel özelliklerini etkilememektedir. CİS`ler sürekli bir florid salınımı yapabilmesi için ağıza yerel florid uygulanması gerekmektedir. CİS uygulamasından 1 ay sonra florid salınımı düşmeye başlar ve 1 yılın sonunda minimum seviyesine inmektedir (68).

CİS`lerin dezavantajları ise hidratasyon ve dehidratasyona duyarlı olmasının yanında ağız sıvılarında çözünmesi ve aşınma direncinin düşük olmasıdır ( 67, 69).

CİS`lerde günümüze kadar fiziksel ve mekanik özellikleri geliştirmek için birçok değişiklikler yapılarak farklı tiplerde CİS`ler üretilmiştir ( 48 ).

#### **2.1.2.1. Cam İyonomerler Simanların Tipleri**

Tip I. Yapıştırıcı cam iyonomer simanlar

Tip II. Restoratif cam iyonomer simanlar

-Estetik cam iyonomer simanlar

-Güçlendirilmiş cam iyonomer simanlar (Cam Sermet)

Tip III. Çabuk sertleşen cam iyonomer simanlar

-Cam iyonomer esaslı kaide maddeleri

-Cam iyonomer esaslı fissür örtücüler

Tip IV. Rezin modifiye cam iyonomer simanları (70).

Son yıllarda cam iyonomer içerikli restoratif materyaller üzerinde birçok çalışmalar yapılmakta ve yeni gelişmeler olmaktadır.

### **2.1.2.2. Restoratif Cam İyonomer Simanlar**

1990 yıllarında atravmatik restoratif tedavi yönteminde kullanılmak için tasarlanmıştır. Cam iyonomer simanlar kompozit rezinlere göre aşınma dirençleri ve basma dayanımları düşük olduğu için klinik uygulamalarda bu olumsuz yönlerini önüne geçebilmekle beraber estetik yönünü de arttırmak amacıyla cam iyonomer simanların 190 MPa basma dayanımı 250 MPa'ya kadar çıkartılarak yüksek viskoziteli cam iyonomer simanlar üretilmiştir (71). 30 MPa olan esneklik direnci ise 45 MPa'a yükseltilmiştir. Bu sayede geniş restorasyonlarda kullanılabilir. Yüksek viskozite olması bu tür materyallerin içerisinde bulunan partikül boyutlarının dağılımı ve poliakrilik asit eklenmesi ile sağlanmaktadır. Bu yüksek viskoziteli cam iyonomerler kondanse edilebilir cam iyonomerler olarak da adlandırılmaktadır. Diş hekimliğinde bu tür CİS'ler geleneksel CİS'lere göre uygulanması daha kolay ve estetik özellikleri iyi olması nedeniyle özellikle geriatrik diş hekimliğinde kullanımı tercih edilmektedir.

N-Vinylcaprolactam eklenmesi, nanopartiküllerin eklenmesi, ısı uygulanması ve yüzey örtücü materyaller uygulanması gibi işlemler ile CİS'lerin fiziksel özellikleri arttırılmaktadır (72, 73).

### **2.1.3. Dental CAD/CAM Sistemlerinde Kullanılan Seramikler (Cerec)**

Bilgisayar destekli tasarım ve bilgisayar destekli üretim anlamına gelen CAD/CAM " Computer Aided Design/Computer Aided Manufacturing " terimlerinin kısaltması olarak bilinmektedir. Bu sistem, preparasyon yapılan bölgenin ölçüsünün bilgisayara aktarılarak digital ortamda seramik, kompozit veya metal bloklardan yapılacak restorasyonların tasarımlarının gerçekleşmesini sağlar ( 74, 75, 76). Bu sistemlerin diş hekimliğinde inlay, onlay, lamina veneer, sabit hareketli protez ve implant destekli protez yapımı gibi çok geniş endikasyonları vardır. Restorasyonlar bu sistemler sayesinde geleneksel ölçü yöntemlerine göre teknisyene bağlı oluşabilecek hatalar azaltılıp kalitesi arttırılarak daha kısa sürede yapılması sağlanmıştır. Dental CAD/CAM sistemlerinde kullanılan prefabrik bloklardan oluşan materyaller yoğun ve homojen yapıda oldukları için konvansiyonel yöntemle yapılmış restorasyonlar yapılarında görülen çok sayıda porozite bu bloklarla yapılan restorasyonlarda gözlenmemektedir. Dolayısıyla mekanik özellikleri gelişirken polisaj süresi azalmaktadır. Dental CAD/CAM sistemlerinde çeşitli materyallerde mevcut olup

bunlar;

- Felspatik porselen esaslı seramikler
- Lösitle güçlendirilmiş cam seramikler
- Lityum silikatla güçlendirilmiş cam seramikler
- Silikat cam seramikler
- Rezin Nano Seramikler
- Zirkonya

### **2.1.3.1. Rezin Nano Seramikler**

Rezin ve seramik materyallerinin karışımı olan bu tür blokların üretim aşamasında silan uygulanması ile resin matriks ve nanomer yapı arasında kimyasal bir bağlanma olmaktadır. Bu tip seramikler sinterize edilmiş matriks yapılar arasında oluşan boşluklara polimer materyallerin girmesiyle elde edilmektedir. Bu polimer yapılar polimetilmetakrilattan (PMMA) oluşmaktadır. Dolayısıyla çatlakların oluşumu azaltılması bu polimerler sayesinde sağlanmaktadır (77). Rezin matriks içerisinde bulunan yüksek oranda nanomer ve nanopartikül seramik materyalin yüksek aşınma ve kırılma dayanıklılığı göstermektedir. Yüksek direnci olmasıyla birlikte elastisite modülü dentine yakın olup fonksiyon sırasında dişe gelen kuvvetleri dişe birlikte absorbe edebilmektedir. Bu tür seramikler cam seramiklere göre daha az kırılmandır ve yüksek esneklik özelliğini göstermektedir. 200 MPa'lık esneklik direnci ile antagonist dişlerde diğer seramiklere göre daha az aşındırma meydana gelirken yüzey cilalanması da kolaylıkla yapılması sağlanmaktadır. Ayrıca materyalin kolay polisajına imkan sağlarken cam seramiklerle benzerlik olup kompozit materyallere göre çok daha yüksektir. Bu tür materyallerin dişe benzer floresans özelliği olduğu için estetik gerektiren alanlarda kullanılabilir (3M Espe 2014) (77, 78).

### **2.1.3.2. Lityum Silikatla Güçlendirilmiş Cam Seramikler**

Lityum disilikat bloklar lityum dioksit, fosfor oksit, kuartz, potasyum oksit ve alumina oksit gibi komponentlerden oluşmaktadır. Bu tür seramiklerin üretim sırasında kısmi olarak kristalize edilen seramik bloklardaki temel kristal faz mavi renkte olan lityum

metasilikattır ( $\text{Li}_2\text{SiO}_3$ ). Kısmi kristalize edilmesinin nedeni frezleme işlemi sırasında seramiğe yeterli direnci kazandırarak çatlak oluşumunu önlenmektir. Bu aşamadaki dayanımı 130-150 MPa'dır (79, 80 ). Daha sonra 850 derecede 20-30 dk bekletilerek kristalizasyon işlemi yapılır (81). Bu işlem sonucunda mavi renkten doğal diş rengine döner ve dayanımı 360-400 MPa ya çıkmaktadır (82).

Lityum disilikat estetik açıdan çok yönlü bir materyaldir (83).

## 2.2. Oral Kavitenin Mikrobiyal Yapısı

Oral kavite nem, sıcaklık, farklı oksijen seviyelerinde bölgelere sahip olması ve çeşitli besin kaynaklarının bulunması nedeniyle mikroorganizmaların yerleşmesi ve yaşaması için uygun çevre şartlarını içermektedir. Bu nedenle oral kavite farklı türlerde çok sayıda mikroorganizmayı barındırmaktadır (84, 85).

Doğumda steril olan oral kaviteye, beslenmenin başlaması ve dişlerin sürmesi ile mikroorganizmalar yerleşmeye başlarlar (86). Mikroorganizmalar tükürük yoluyla taşınır. Streptokoklar ve gram negatif bakteri türleri çocuğa anneden geçmektedir. Oral kaviteye ilk yerleşen türler, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mitis* ve *Streptococcus oralis*'tir. Daha sonra *Prevotella melaninogenica*, *Fusobacterium nucleatum* ve *Veillonella* türleri gibi gram-negatif anaeroblar yerleşir. Dişler mikroorganizmaların tutunabileceği bir yüzeye sahiptir. Mikroorganizmalar diş yüzeyinde kolonize olurlar. Bu ise dental plak oluşumu ile bakterilerin birikmesine neden olur. Süt dişlerinin sürmesiyle birlikte, *S.mutans* ve *S.sanguis* ağız içine yerleşir ve oluşan dental plak, yerleşmesi zor bakteri türleri için ortamı uygun hale getirir. Ayrıca kole bölgesindeki diş eti oluşu sıvısı (DOS), zorunlu anaeroblar için besin kaynağı oluşturur (87). Oral mikrobiyotada stabil bir topluluk oluşuncaya kadar mikrobiyal çeşitlilik artmaya devam eder. Daimi dişlerin sürmesiyle, spiroketler, fusiform basiller, vibriolar ve leptotrichia türlerinde artış görülür. Hücresel bağışıklık sisteminin zayıflamasıyla oral kavitedeki non-oral bakteriler (stafilokok, enterokok) artar. Yaşın ilerlemesiyle birlikte, mayalar oral kaviteye kolonize olmaya başlar. İlerleyen yaşla birlikte diş kayıpları görüldüğünde ise, *S.sanguis* ve *S.mutans* yerini anaerobik bakterilere bırakır (88, 89 ). Diyetteki değişiklikler, hormonal değişiklikler ve oral hijyende meydana gelen değişiklikler ile çok az etkilense de mikrobiyota çok fazla değişmez (86).

Oral kavitede aerobik mikroorganizmalar yanında anaerobik ve fakültatif anaerobik bakteriler dil, diş gibi kısımlara yerleşerek bu bölgeyi bakteri yerleşimi için uygun hale getirirler. Mikroorganizmalar genellikle, tükürükle yıkanmayacak ve yutulmayacak yerlere yerleşirler (86).

Tükürük, oral mikrofloranın gelişmesi ve metabolik aktivitesinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Tükürük pH'sının 6,75-7,25 ve sıcaklığının 35-36°C olması mikroorganizmaların gelişimi için uygun bir ortam yaratır. Tükürük içinde bulunan glikoprotein ve proteinler, peptid ve amino asit kaynağı olarak görev yapar ve mikrobiyal gelişim için yeterli miktarda karbonhidrat içerir. Ayrıca, tükürük doğal ve özel bağışıklık faktörlerin de kaynağını oluşturmaktadır (86).

Bakteriler, oral kaviteye yerleştikten sonra karbonhidratça zengin gıda ile beslenme, oral bakterilerin gelişim hızını arttırır (86). Ağız boşluğunda 700 kadar bakteri türü tanımlanmıştır. Bu bakterilerden 300 kadarı dil, ağız mukoza membranları, çürük lezyonları ve endodontik enfeksiyonlar gibi ağız bölgelerinde saptanırken 400'ü subgingival bölgede belirlenmiştir. Kişilere göre değişmekle birlikte belirlenen 700 türün yaklaşık 100-200'üne bireylerin sahip olduğu saptanmıştır (85, 90). Bakımlı olmayan bir ağızda bulunan bir dişteki bakteri sayısı 100 milyon - 1 milyar arasında değişmektedir (91) .

Ağızdaki endojen mikroflora, kommensal bakterilerden, az sayıdaki mayalardan ve çevre kendilerine uygun olarak değiştiğinde endojen mikrofloraya dahil olabilen ek mikroflora olarak tanımlanan türlerden oluşur. Sağlıklı bir ağızda *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Veillonella*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Treponema*, *Neisseria*, *Haemophilis*, *Eubacteria*, *Lactobacterium*, *Capnocytophaga*, *Eikenella*, *Leptotrichia*, *Peptostreptococcus*, *Staphylococcus* ve *Propionibacterium* bulunmaktadır (92,93). Kommensal türler, çevredeki değişikliklere ve kişinin ağız hijyenine bağlı olarak zararlı ya da yararlı olabilir (94).

Ağızda bulunan mikroorganizmaların çoğu, biyofilm içindeki mikroorganizmalara aittir (95). Biyofilm, oral ekolojisinin değişmesinde bile oldukça sabit kalır.

Ağız ve diş hastalıklarının büyük çoğunluğu ağız biyofilmlerindeki dengenin bozulmasından kaynaklanır (96, 97). Endojen mikrofloranın faydalı faaliyetlerinden biri de patojenlerin neden olduğu enfeksiyonlardan korunmayı sağlamaktır. Bu özellik kolonizasyon direnci olarak adlandırılır. Eksojen mikroorganizmalar için istenmeyen

çevresel şartların oluşturulması, inhibitör maddelerin üretilmesi, tutunma bölgeleri ve besinler için rekabete girme, kolonizasyon direnciyle ilgili mekanizmalardır (98).

### **2.3.Biyofilm**

Biyofilm, bir yüzeye yapışarak, belirli bir yapısal bütünlük içerisinde toplu halde yaşayan ve birbirleriyle haberleşerek varlıklarının devamı için gerekli işlevlerin yerine getirilmesini sağlayan bakterilerin oluşturduğu karmaşık bir organizasyondur (99, 100).

Biyofilmlerin ilk olarak 17. yüzyılda Anton Van Leeuwenhoek tarafından tanımlanmıştır. O dönemde dışın üzerindeki plaktan aldığı örneği inceleyen ve mikroskop altında mikrobiyal kümelerin varlığını izleyen Leeuwenhoek' un, baktığı şeyin biyofilm olduğunun farkında olmadığı bildirilmiştir (101).

İlk olarak 1976 yılında Marshal, biyofilmin çok ince bir ekstrasellüler polimer fibril olduğunu ve bakterinin yüzeye tutunmasında önemli olduğunu bildirmiştir. Biyofilm hakkındaki genel teori 1970' li yıllardan sonra netlik kazanmış bunun da ötesine geçerek bakterilerin multisellüler davranış sergilemeye başlaması ile mikrobiyolojiye bakış açısı da değişmiştir (102, 103).

Costerton ve ark. (101), akarsuların içerisinde yaşayan bakterileri incelerken bakterilerin %99.99'nun bir yüzeye yapışarak, balçık benzeri bir yapı içerisinde yaşadıklarını ortaya koymuş bu toplulukları tanımlamak amacıyla da ilk defa 'biyofilm' terimini kullanmıştır.

Davey ve O'toole (104), biyofilm tabakasının sadece yüzeye yapışmış durumda bulunan ve içerisinde mikroorganizmaların bulunduğu homojen bir tabakadan ibaret olmadığını, bakterilerin belirli bir yapıya sahip, koordinasyon yeteneği bulunan fonksiyonel toplulukların oluşturduğu biyolojik sistemler olduğunu ortaya koymuştur.

Biyofilm tanımı son 30 yıl içerisinde elde edilen bilgiler ışığında geliştirilmiştir. Costerton ve ark. (101), bakterilerin polisakkarit yapıda bir glikokaliks matriks içerisinde bulunduğunu ve bu yapının adezyonu kolaylaştırdığını gözlemlemişlerdir. Araştırmacılar, biyofilmlerin yüksek oranda sulu (hidrate) anyonik ekzopolimer matriks içinde bulunan mikrokoloniler olduğunu belirtmiştir. Watnick ve Kolter (105), biyofilmi, cansız ya da canlı bir yüzeye tutunmuş birçok bakterinin salgıladıkları muköz yapı içerisinde bir araya

gelmesiyle oluşan “ mikroplar şehri ” olarak tanımlamışlardır. Bir grup araştırmacı ise; biyofilmi, mikrobiyal olarak değişime uğramış, yüzeye ya da birbirine tutunarak matriks ya da hücre dışı polimerik madde içine gömülmüş olan planktonik hücrelerden çoğalma, genetik yapı ve protein sentezi açısından tamamen değişik yapıda olan biyolojik bir oluşum olarak tanımlamaktadırlar (105,106, 107).

Biyofilmin en yeni tanımı ise canlı ya da cansız bir yüzeye yapışarak kendi ürettikleri organik bir ekzopolisakkarit matriks içine gömülü ve hareketsiz olarak birbirine, bir katı yüzeye ya da bir ara yüzeye tutunmuş genetik yapı ve protein sentezi açısından serbest dolaşan türdeşlerinden tamamen değişik yapıda olan mikroorganizmaların oluşturduğu topluluk olarak yapılmaktadır (108, 109).

Bir yüzeyde koloniler halinde tutunarak yaşayan bazı mikroorganizmaların oluşturdukları her tabaka da biyofilm değildir. Bu hücreler biyofilmdeki hücrelerin sahip olduğu özellikleri göstermezler. Üç boyutlu açıdan bakıldığında biyofilmler, matriksleri içerisinde yaşamlarını sürdüren, hücrelere besinlerin ve oksijenin taşınmasına imkan tanıyan su kanallarına ve çok tabakalı heterojen bir yapıya sahiptirler. Biyofilm yapısının büyük bölümü (%73-98) sulu (hidrate) şekildedir. Biyofilm oluşumunda mikroorganizmalar birbirleri ile farklı sinyal molekülleri aracılığıyla iletişim kurmaktadır. Sinyal moleküllerinin algılanması, bakterinin bulunduğu ortamda düşük veya yüksek miktardaki populasyon yoğunluğunu ayırt edebilmesini mümkün kılar. Başka bir deyimle çoğunluğu algılama bir bakteri populasyonunda gen ekspresyonunun, bütün bir popülasyonun gen ekspresyonu dikkate alınarak koordineli bir şekilde gerçekleşmesini ve kontrol edilmesini sağlayan bir iletişim mekanizmasıdır (110). Bakteriler, biyofilm oluşumunu hücreden hücreye yollanan iletişim sinyalleri aracılığı ile kontrol etmektedirler. Biyofilm oluşum sürecinde quorum sensing (QS, çoğunluğu algılama) molekülleri adezyonda, mikrokolonilerin oluşumunda ve sonrasında biyofilm içinde kanalcıklar açmak suretiyle biyofilmden kopan mikroorganizmaların bir başka yere gidip tutunmasında görev almaktadırlar (111).

Bakteriler birbirleriyle haberleşmek amacıyla 3 tip sinyal molekülü kullanmaktadır (112).

**1.Açıl Homoserin Lakton (AHL, Acyl-Homoserine lactones) :** Bu tip QS iletişimi daha çok gram negatif bakterilerde görülmektedir.

**2.Autoinducer- 2 (AI-2) :** Bu sinyal molekülü gram pozitif ve gram negatif bakterilerce üretilmektedir. Biyofilmler arasındaki iletişimin AI-2 sinyalleri aracılığı ile



düzenlendiği belirlenmiştir. Farklı bakteriler arasındaki iletişimin ve biyofilm oluşumunun AI-2 sinyalleri tarafından yönetildiğini ortaya konmuştur.

**3.Autoinducer Peptider (AIP) :** Özellikle gram pozitif bakteriler tarafından üretilen ve AIP olarak ifade edilen QS moleküllerinin birçoğu translasyon sonrası değişikliğe uğrayan büyük peptidlerden üretildiği bildirilmiştir.

Bakteri kendinden güçlü ve daha yetenekli bakterinin DNA' sını alarak kendi DNA' sını değiştirmektedir. AIP miktarı yeterli düzeyde olmayan bakterilerde biyofilm oluşumu özelliklerinin azaldığı belirlenmiştir. Yapılan çalışmalarda ilave sentetik AIP verilmesinin de farklı streptokok türlerinin kütlelerinde artışa neden olduğu kanıtlanmıştır

Biyofilme sahip organizmalar; besin yoksunluğu, pH değişiklikleri, oksijen radikalleri, dezenfektanlar, antibiyotikler gibi etkenlere karşı planktonik hücrelerden çok daha dirençlidirler. Bakterilerin kümeler halinde ve EPS matriks içerisinde bulunmaları, fagosite edilmelerini güçleştirir ve hümoral immün sistem bileşenlerinin bakterilere ulaşmalarını engeller (113).

### **2.3.1.Oral Biyofilm**

Diş plağı, diş yüzeyine tutunmuş karmaşık mikroorganizma toplulukları olarak tanımlanmaktadır ve bu özelliğiyle biyofilm yapısı ile benzerlik göstermektedir. Bu nedenden dolayı son yıllarda yapılan birçok çalışmayla birlikte plak, biyofilm olarak değerlendirilmektedir. Biyofilm bütün olarak bakıldığında içerisinde yaklaşık 700 civarlarında bakteri türü barındırmaktadır. Yeni türler de hala izole edilmektedir (114, 115).

Diş plağı, diş yüzeyine sıkıca yapışan ve suyla çalkalama ile uzaklaştırılmayan yumuşak materyal olarak tanımlanır. 1mm<sup>2</sup>'lik diş yüzeyinde bulunan diş plağında 200 çeşitten fazla mikroorganizma bulunmaktadır (116). Diş plağı oluşumunda bakteri kolonizasyonu, diş yüzeyindeki pelikül ile bakterilerin yüzey molekülleri arasındaki etkileşime bağlıdır. Pelikül, diş yüzeyinin kaplı olduğu ekstraselüler protein benzeri bir yapıdır. Diş yüzeylerinin diş fırçası ya da profesyonel yöntemlerle temizlenmesinden yaklaşık 20 dakika sonra, yüzeyler tükürük pelikülü tarafından kaplanır (115). Pelikül, homojen, membranöz, hücre içermeyen, tükürük glikoproteinlerinden ve tükürük proteinlerinden oluşmuş ince, düz, renksiz, saydam bir film tabakasıdır. Yapısında kollajen, keratin ve melanin bulunmaktadır. Alttaki diş yüzeyine sıkıca bağlanmaktadır. Polisajla düzgün yüzeylerden kolaylıkla uzaklaştırılır ancak çok kısa bir sürede yeniden oluşur.

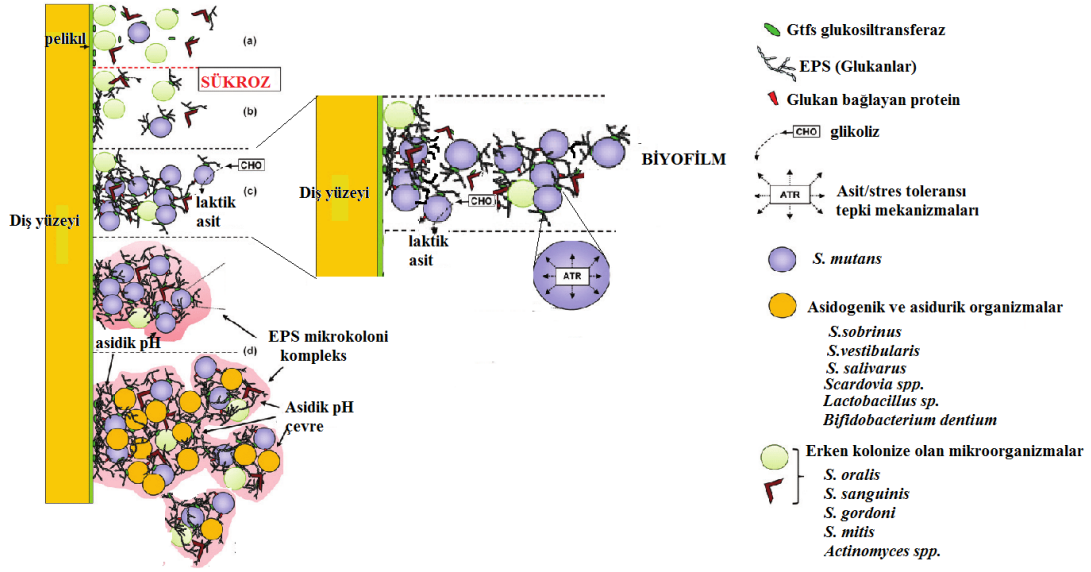
Elektron mikroskop çalışmaları dişlerin temizlenmesini takiben 2 saat sonra diş yüzeyinde 0.1 - 0.7 $\mu$  kalınlığında organik bir tabaka oluştuğunu göstermiştir. Pelikül yalnızca dişler üzerinde meydana gelmez, dişler üzerine bağlanan ortodontik aparatlarda, dolgular ve protezler üzerinde de meydana gelir. Pelikül primer kolonizasyon için bir substrat görevi görmektedir (104, 115). Aynı zamanda diş yüzeyinin kayganlaşmasını sağlayarak etkili bir çiğneme sağlamakta ve diş demineralizasyondan korumaktadır (117). Tükürük glikoproteinleri, fosfoproteinleri, lipid, az miktarda diş eti oluşu sıvısı ve ölmüş bakteri hücreleri kalıntıları pelikül yapısında yer alır. Pelikül asitte çözünen ve çözünmeyen kısımlardan oluşur. Asitte çözünmeyen kısım diş yüzeyinin asitlere karşı korunmasında etkilidir. Tüm pelikülda (asitte çözünen + çözünmeyen) yüksek oranda glisin, serin, glutamik asit vardır. Bunları aspartik asit, proline, alanin ve lösin izler. Tüm pelikül sülfür ve aromatik amino asitleri taşır. Tüm pelikülda karbonhidratlar glikoz, galaktoz, glikosamine, mannoz ve fruktoz'dur. Amilaz, lizozim, Ig A gibi tükürük proteinleri de pelikülda bulunur. Yine albümin, Ig G, Ig M' de çoğu kez pelikülda görülmüştür.

Dişlerdeki başlangıç kolonizasyonu *S.mutans* dışında mikroorganizmalarla başlamaktadır. *S.mutans* tek başına diş yüzeyine tutunma yeteneğine sahip değildir. Diş yüzeyindeki peliküla ilk tutunan bakteriler gram pozitif kok formundaki bakterilerdir, ayrıca az sayıda epitel hücresi ve nötrofillerde ilk tutunan hücresel elemanlardır. Daha sonra ise gram pozitif çubuk, gram negatif anaerobik kok ve fusiformlar diş yüzeyine yerleşmeye başlamaktadır. Pelikül oluşumdan sonra, diş sert yüzeyine ilk kolonize olan bakteriler *S.oralis*, *S.mitis*, *S.goroni*, *S.sanguis* ve *Actinomyces*'tir (118). Bu bakteriler diş yüzeyine bakteri yüzeyindeki adezinler ile pelikülda reseptörler arasında oluşan Van der Waal's kuvvetleri ile tutunurlar (116). Tükürüğün yapısında bulunan sialik asit zincirleri yoluyla *S.sanguis* ve *S.oralis* diş yüzeyine tutunurlar. Benzer şekilde, *Actinomyces naeslundii* de prolinden zengin protein ve staterin yardımıyla diş yüzeyine tutunur. Diş yüzeyinin hidrofobitesinin yüksek olması da bağlanma gücünü attırmaktadır. Birkaç bakterinin biyofilm tabakası üzerine tutunmasını takiben (erken kolonizasyon), yüzey özellikleri ortamda bulunan diğer bakterilerin yüzeye tutunabilmeleri ve hayatta kalabilmeleri için elverişli hale gelir (115).

Daha sonra, ikincil kolonizasyon başlar, buradaki tutunum mekanizmasında ise, ilk kolonize olan türler ile yeni kolonize olmaya başlayan türler arasında oluşan koagregasyon ve koadezyon rol oynar. İkincil olarak kolonize olan türler; *Capnocytophaga*, *Haemophilus*, *Eikenella*, *Prevotella*, *Propionibacterium* ve *Veillonella* türleridir. Mevcut

mikroorganizmalar üzerine ortamda bulunan yeni mikroorganizmaların koadezyonu gerçekleşir. Koadezyon dış plağının işlevsel organizasyonunun da değişimine neden olur. Biyofilm içerisindeki bakteriler hem zıt hem de aynı biyokimyasal etkilerin görüldüğü ortamlarda yer almaktadırlar (118). Bu sayede anaerobik bakterilerin oksijen tüketim alanlarına koadezyonu, bakterilerin aerobik ortamlarda da hayatta kalabilmelerine neden olmaktadır (119). Dış yüzeyindeki bakteri kalınlığı arttıkça başlangıçta aerobik olan mikroorganizmalar, yerini fakültatif anaerobik ve zorunlu anaerobik mikroorganizmalara bırakır. Böylece meydana gelen olgun plak, yüksek hızlı dinamik bir süreç ile yapısını korur. Laktobasiller anaerobik olmasına rağmen plağın yapısında genellikle bulunmazken, *Actinomyces* türleri özellikle *A.naeslundii* ve *Veillonella* türleri sıklıkla bulunur. Olgun plakta ise *Treponema denticola* gibi spiroketler ve çeşitli anaerobik gram negatif rodlar bulunur. *F.nucleatum*'un ise ilk ve ikinci kolonizasyon arasında bir köprü görevi gördüğü bildirilmiştir (120). Bakteri tutulumu sonrasında var olan bakterilerin hücre bölünmeleri ile büyüme gerçekleşmektedir. Sonunda üç boyutlu, işlevsel olarak organize olmuş ve karışık mikroorganizma topluluklarına sahip biyofilm başka bir değişle plak formasyonu oluşmuş olur (119).

Olgun dış plağı 5 aşamada meydana gelmektedir (Şekil 2.1). İlk aşama, dış yüzeyinde pelikül oluşumu; ikinci aşama, öncü bakterilerin dış yüzeyine tutunması (4 saat); üçüncü aşama, tutunan bakterilerin farklı mikro koloniler oluşturması (4-24 saat); dördüncü aşama, mikrobiyal artış ve koagregasyon ile mikro kolonilerin gelişmesi (1-14 gün) ve son aşamada ise olgun biyofilmin oluşumudur (2 hafta ve üstü) (86).



**Şekil 2.1.** Karyojenik biyofilm oluşumu (Koo ve ark.2013 ve Klein ve ark 2013 den alınarak düzenlenmiştir).

### 2.3.2. Restoratif Materyallerde Biyofilm Oluşumu ve Etkili Faktörler

Restoratif materyaller üzerinde biyofilm oluşumu birçok faktöre bağlıdır. Farklı restoratif materyallerde biyofilm oluşumu araştırılmıştır. Restoratif materyaller üzerine bakterilerin adezyonu materyalin yüzey yapısına ve yüzeyin pürüzlülüğüne bağlı olarak değişmektedir ( 10, 121, 122, 123). Pürüzlü yüzeylerin serbest yüzey enerjisi fazla olduğu için biyofilm oluşumu için uygun ortam hazırlamaktadır. İyi cilalanmış yüzeylerde biyofilm oluşumu daha düşüktür (121). Ancak yüzey pürüzlülüğünün biyofilm üzerine etkisi materyale göre de değişmektedir. Restoratif materyallerin kimyasal bileşimi bakteri adezyonunu etkilemektedir (10). Rezin kompozitlerde yüzey pürüzlülüğü önem taşırken cam iyonomerler de ise yüzey özellikleri büyük önem taşımamaktadır (122). Seramik yüzeylerde daha ince biyofilm oluşmaktadır (9, 124). Ancak seramik malzemelerde canlı bakteri sayısı daha yüksektir ( 125 ).

Restoratif materyallerin adeziv özellikleri de biyofilm oluşumu üzerine etkilidir. Adeziv özelliği düşük olan materyallerde biyofilm oluşumu düşük olmaktadır (122). Biyofilm birikimi matriks monomer ve doldurucu büyüklüğüne göre değişiklik göstermektedir (126). Metakrilat monomer içeren kompozit rezinlerde polimerize olmayan artık monomerler salınarak oral kaviteye dağılmaktadır ( 127 ). Bu nedenle polimerik yapı ile birleşmeyen artık monomer tipleri önem taşımaktadır (128).

Restoratif materyallerde biyofilm oluşması materyalin mikrosertliğini azaltmakta ve pürüzlülüğü artırmaktadır. Kompozit rezin restorasyonlarda kenar bütünlüğü bozulmakta ve aşınma görülmektedir. Bu durumda restorasyonun çevresinde diş sert dokusu ile arasında sekonder çürük oluşmaktadır (129, 130, 131, 18). Karyojenik biyofilm kompozit rezin ve modifiye rezin cam iyonmer simanın yüzeyin bozulmasına neden olmaktadır. Yapılan bir çalışmada üzerinde biyofilm oluşan cam iyonmer materyallerin daha hızlı bozulduğu ancak kompozit rezinlerde bu durumun gözlenmediği bildirilmiştir (132).

Souza ve ark (133), rezin bazlı materyallerde karyojenik plak birikimi olduğunu gözlemişlerdir. *S.mutans* kompozit rezinlere cam iyonmer simandan daha yüksek oranda yapışmaktadır. Seramik yüzeylerde ise bakteri adezyonu ve glukoz miktarı daha düşük olarak bulunmuştur (129, 134).

Tükürük proteinlerinin restoratif materyale adezyonu da biyofilm oluşumunda önem taşımaktadır. Tükürük proteinleri restoratif materyallere farklı adeziv özellik göstermektedir (125). Albumin, bakteri adezyonunu ve birikimini artırmaktadır (135).

### **2.3.3. Diş Çürüğüne Neden Olan Mikroorganizmalar**

Diş çürüğü, asit üreten bakterilerin karbonhidratları fermente etmesi yoluyla diş sert dokularında yıkımına neden olan kronik, enfeksiyöz ve bulaşıcı bir hastalıktır (38, 136 ).

Diş çürüğünün meydana gelebilmesi için, çürüğe hassas bir konak, diyetle fermente olabilen karbonhidratlar, asidürük ve asidojenik mikroorganizmalar ve zamana ihtiyaç vardır. Mikroorganizmalar diş yüzeyinde adsorbe olarak burada biyofilm oluşturabilirler. Gıdalarla alınan karbonhidratları mikroorganizmalar kullanarak asit oluştururlar. Oluşan bu asit diş yapısının bozulmasına neden olur. Tükürük de çürük oluşumunda rol oynamaktadır. Tükürüğün akış hızı içerdiği mikroorganizmalar önem taşımaktadır ( 116, 136 ). Ağızda mikroorganizmalar ve karbonhidratlar olmadığı zaman çürük oluşmamaktadır (116 ).

Diş çürüğünde etkili olan mikroorganizmalar arasında ilk sırayı *S.mutans* almaktadır. Diş plağında yer alan ve asidojenik olan ve asidi tolere edebilme özelliği olan *S.mitis*, *S.gordonii*, *S.anginosus* ve *S.oralis* gibi bakteriler, *S.mutans*'ın gelişmesi için uygun çevresel koşulların oluşmasında önemli rol oynarlar (20, 38). Fissür çürük oluşmasına eğilimlidir. Fissürlere ilişkin çalışmalar, mutans streptokokların (çoğunlukla *S.mutans* ve *S.sobrinus*) oranlarının artması ile çürük lezyonunun saptanması arasında güçlü bir ilişki

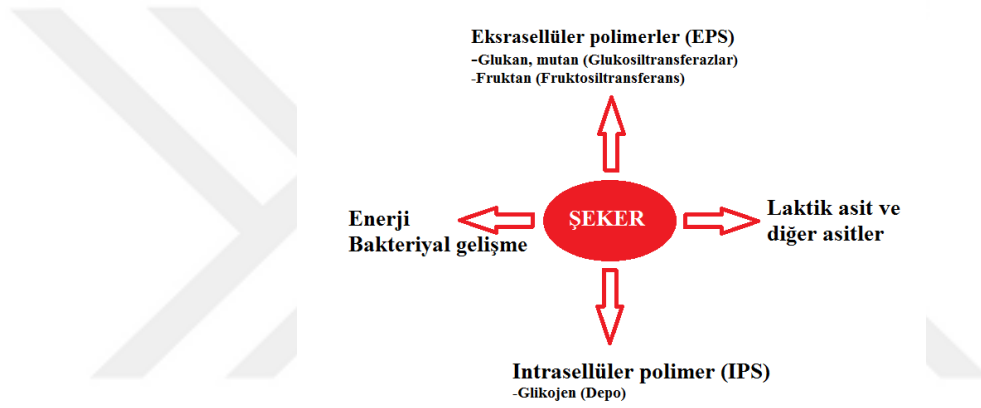
olduğunu ortaya koymuştur (137). Diş yüzeyinde bulunan biyofilmde bu mikroorganizmaların bulunmadığı yine bu durumun aksine lezyonun olmadığı durumlarda mutans streptokokların bulunması nedeniyle bu ilişki tam olarak belirlenememiştir. Yapılan çalışmalarda kısa süreli çalışmalarda yüksek mutans streptokok seviyesi ile çürük arasında pozitif bir ilişki bulunurken uzun süreli çalışmalarda net bir ilişki bulunamamıştır (138, 139). Son yapılan çalışmalarda uygun besiyerleri kullanıldığı zaman bifidobacteria gibi bazı bakterilerin çürükle ilişkili olabileceği vurgulanmıştır (140). Son yıllarda kültür bağımsız moleküler teknikler kullanılarak yada kültürel ve moleküler teknikler kullanılarak yapılan çalışmalarda dental biyofilmdeki mikrobiyota analiz edilmiştir. Tanner ve ark (141) erken çocuklukta farklı diş yüzeylerinde görülen şiddetli çürüklerde *S. mutans*, *Scardovia wiggsiae*, *Veillonella parvula*, *Streptococcus cristatus* and *Actinomyces gerencseriae* belirlemiştir. *S. sanguinis* sağlam diş minesi ile ilgiliyken *A. gerencseriae*, *Bifidobacterium* spp. *S. mutans*, *S. salivarius*, *S. constellatus*, *S. parasanguinis*, *L. fermentum* ve *Veillonella* spp. çürükle ilgili olarak belirlenmiştir (142). *Actinomyces* spp. çürük başlatmada etkinken *Bifidobacterium* spp. daha gelişmiş lezyonların oluşmasında rol oynayabilmektedir (143).

Benzer şekilde, çocuklarda birincil ve kalıcı dişlerde oluşan çürüklerde yapılan moleküler tabanlı bir çalışmada, *S. mutans*'a ek olarak çeşitli türlerin çürük ilerlemesinde rol oynadığı gösterilmiştir; Bu bakteriler *Veillonella*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, *Actinomyces*, *Atopobium* ve streptokok türleridir (144). *Actinomyces*, *Bifidobacterium*, *Rothia*, *Veillonella*, *Candida*, enterekoklar ve gram negatif türler sıklıkla kök çürüklerinden izole edilmektedir (20, 38).

Farklı ülkelerde ve popülasyonlarda farklı yaş gruplarında yapılan çalışmada diş yüzeylerinde oluşan demineralizasyon ile *S. mutans* sayısı ve beslenme alışkanlıkları arasında pozitif bir ilişki bulunmuştur. Ancak bu çalışmada Streptokoklar ve laktobasiller gibi bütün bakteriler tanımlanmamıştır. Çürük karmaşık bir mikrobiyolojik süreçtir. Bir biyofilmde asit üreten ve asit kullanan veya aside karşı koruyucu türler bulunabilir ve bu bakteriler arasında meydana gelen bir dizi etkileşimin sonucu çürük oluşmaktadır (144). Biyofilm içindeki bazı bakteriler demineralizasyona katkıda bulunsun da, *Veillonella* spp. gibi bazı bakteriler de şeker metabolizması ile üretilen laktatın ya da tükürükte bulunan *S. salivarius*, *S. sanguinis*, *A. naeslundii* gibi bakteriler ise alkol üretmek suretiyle asit üretiminin etkisini azaltabilmektedir (139). Karyojenik özellik gösteren bakteriler, plak yapısına katılan diğer bakteriler ile rekabet ederken ortamda bulunan fermente olabilir

şekerleri hızla hücre içine alarak metabolize ederek asit üretiyorlar. Buda pH'nın düşmesine neden olur (Şekil 2.2).

Mutans streptokoklar ile birlikte sakkarolitik diğer oral bakteriler şeker taşıma sistemlerine (MS, fosfoenolpiruvat) sahiptirler. Bu bakteriler şeker miktarı çok düşük olduğu zaman bile metabolize eden şeker fosfotransferaz (PEP-PTS) sistemleri bulunmaktadır. Şekerler, glikoliz yoluyla asitlere (ve ağırlıklı olarak laktik asit) dönüştürülür; karyojenik bakteriler, birkaç dakika içinde asit üreterek ortamın pH' nın düşmesine neden olabilir (143). Bu düşük pH'da bir çok bakteri uzun süre canlılığını sürdüremez ancak mutans streptokoklar, laktobasiller ve bifidobakteriler, düşük bir pH' de canlı kalmayı sürdürmekle kalmayıp aynı zamanda büyümeye ve şekerleri metabolize etmeyi sürdürebilirler (143).

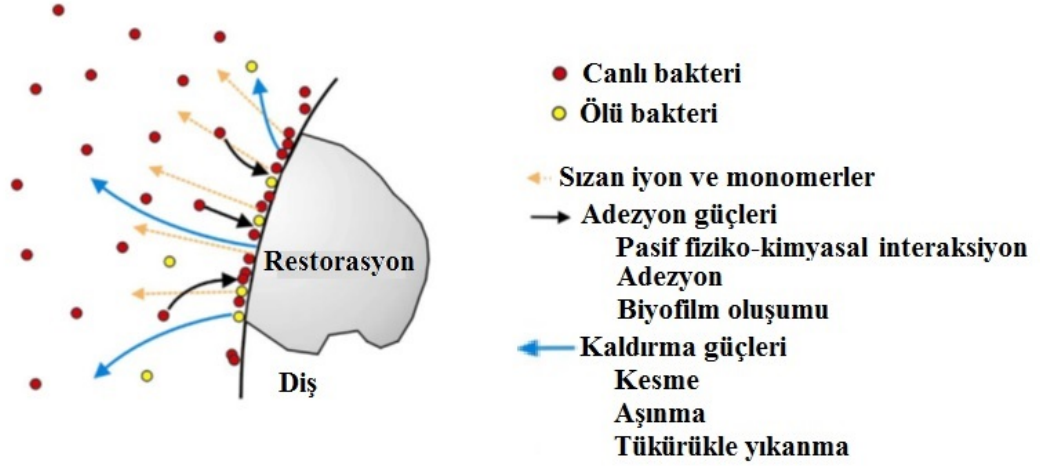


Şekil.2.2 Sükrozun metabolizması (Marsh, 2016)

#### 2.3.4. Plağın Çürük Oluşumundaki Rolü

Normalde, engelleyici bir ortam olmadıkça diş sert dokuları ile tükürük arasında sürekli bir iyon alışverişi söz konusudur. Asidik ortam koşullarında demineralizasyon meydana gelir. Diş sert dokularından kalsiyum fosfat ( $Ca_3(PO_4)_2$ ) gibi iyonlar uzaklaşmaya başlar. Demineralizasyon meydana gelmesiyle birlikte çürük başlangıcı için ortam hazırlanmış olur. Ortamın asidik hale gelmesinde de alınan yiyecek ve içecekler önemli bir rol oynamaktadır. Ancak bu etkiler kısa süreli olup tükürüğün tamponlayıcı ve yıkayıcı gücü ile diştten uzaklaştırılır. Çürük oluşumu için oluşan asit pH' nın düşmesine neden olur. pH'nın düşük kalması diş üzerine etki eder. Dişte çürük başlangıcı adını verdiğimiz, dokudan önce submikroskopik, daha sonra mikroskopik ve en sonunda makroskopik olarak izlenen doku kayıpları meydana gelir.

Ancak çürük için etkili asit ortamı meydana getiren plak içerisinde yaşayan ve fermente olabilen karbonhidratları metabolize ederek asit meydana getiren mikroorganizmalardır. Böylece demineralizasyon sonucu plak asidojenik mikroorganizmaları barındırması, oluşan asidin uzun süre diş yüzeyini etkilemesine izin vermesi, yine yapısı dolayısı ile tükürüğün yıkayıcı ve tamponlayıcı gücünü engellemesi nedeni ile çürük oluşumuna yol açan ana faktörlerdir. Restorasyon yapılmış dişlerde de benzer mekanizma görülmektedir (Şekil 2.3).



**Şekil 2.3.** Restorasyon yapılmış dişlerde çürük oluşumu (Montanaro ve ark. 2004)

Restoratif materyallerde restorasyondan sonra ortaya çıkan sızıntı ile mikroorganizmalar yüzeyde ve arayüzde biyofilm oluşumunu başlatır (18, 131). Restoratif materyallerde dental biyofilm oluşumu, çok sayıda karyojenik bakteri içeriğiyle sekonder çürüklerin gelişiminde önemli rol oynar. Plakta oluşan asit tipi ve miktarı pek çok faktör tarafından etkilenmektedir. Mikroorganizmaların metabolik faaliyetleri sonucu oluşan asitler; laktik asit, asetik asit, propionik asit olabilir. Ancak bunlar arasında en etkili laktik asittir. Asidik ortam çürük oluşumunda önemli bir rol oynamaktadır ( 18, 131).

Düşük pH, dental plaktaki bakteri gelişiminin büyük bir kısmını inhibe ettiği için, sükrözden zengin diyet mikroflora kompozisyonunu değiştirebilir, bu nedenle daha asidiürik



oral floranın bir parçası haline gelirler. Buna ilaveten, sükröz, glukoziltransferaz (GTF) ve fruktoziltransferaz (FTF) gibi bakteriyel enzimlerle glukoz ve fruktana çevrilir. Glukoz, plak tutunumunu artırır ve plak matriksi oluşumuna katkıda bulunur. Fruktan ise ekstraselüler besin maddesi olarak görev görür. Aşırı miktarda alınan karbonhidrat, bazı türler tarafından intraselüler glikojen deposu olarak depolanır ve bu depolar fermente edilebilen kaynak olmadığında aside metabolize edilir. Tüm bu faktörlerin varlığında, diğer faktörler eşit olduğunda bile çürük gelişimi artar ( 86 ).

Çürüklerin önlenmesi oluşan veya oluşacak biyofilmin engellenmesi ile ortadan olabilir. Bu amaçla geleneksel tedavi metodları yanında çeşitli kimyasal maddeler, aşı uygulamaları, antibiyotikler kullanılabilir (20,38). Son yıllarda probiyotik bakterilerin diş sağlığı üzerine etkisinin anlaşılması ile probiyotikler üzerinde durulmaya başlanmıştır (145, 146, 147).

#### **2.4. Probiyotiklerin Diş Sağlığı Üzerine Etkileri**

Mikroorganizmaların vücudumuza zararlı ve hastalıklara neden olduğu kanısı uzun yıllar kabul görmüştür. Oysa günümüzde sayıları giderek artan bilimsel araştırma sonuçları canlı mikroorganizmaların bazı hastalıkların tedavisinde, hatta önlenmesinde kullanılabileceğine işaret etmektedir (147).

Probiyotik kavramı ilk kez XIX. Yüzyılın başlarında Nobel ödülü sahibi Elie Metchnikoff tarafından gündeme getirilmiştir. Metchnikoff, Bulgar köylülerinin uzun yaşamlarının fazlaca fermente süt ürünü tüketmelerine bağlı olduğunu belirtmiştir. Probiyotik kelimesi Latince “pro” ve “bios” köklerinden türetilmiş ve “yaşam için” anlamına gelmektedir. Besinlerle birlikte veya ayrı olarak alınan, mukozal ve sistemik immüniteyi düzenleyerek, bağırsaklarda besinsel ve mikrobiyal dengeyi sağlayarak konakçının sağlığını olumlu yönde etkileyen canlı mikroorganizmalara probiyotik adı verilir (148).

Probiyotikler gıda komponentleri veya gıda olmayan preparatlar olarak tüketilebilir. Bu güne kadar yapılan çalışmalarda probiyotiklerin uygulanması için sakız, gargara, pastil, çikolata, süt, peynir, yoğurt gibi ürünler kullanılmıştır. Bu taşıyıcı sistemlerin bazı sınırlayıcı yönleri vardır. Örneğin gıdalarla alınan probiyotikler oral kaviteden hızla kaybolurlar. Bu da probiyotiklerin etkinliğini azaltır (149).

Probiyotikler; insanların veya hayvanların doğal mikroflorasına ait özellikleri geliştiren, tüketilmeleri sonucunda ağızda, gastrointestinal sistemde, üst solunum yollarında ya da ürogenital kanallarda yararlı etkileri ile konakçının sağlığında iyileşmeye sebep olan tek veya karışık canlı mikroorganizma kültürleridir (150).

Bu mikroorganizmaların canlı kalabilmeleri ve böylece bağırsaklarda gelişme olanağı bulabilmeleri gerekmektedir. Bağırsak sistemine özgü probiyotikler olarak kullanılan bazı *Lactobacillus* türleri dış çürümelerine neden olan bakterileri inhibe ederek (antibakteriyal madde üretimi ve dış yüzeyindeki tutunma bölgeleri için rekabet gibi mekanizmalarla) etki göstermektedirler.

Probiyotik yardımıyla karyojenik patojenlerin oral kolonizasyonu engellenmeye çalışılmaktadır. Probiyotik bakteriler organik asit, hidrojen peroksit, diasetil, ve bakteriyosin benzeri maddeler oluşturarak, adezyon inhibitörleri salgılayarak etki gösterdikleri bildirilmiştir (149).

Ağız probiyotiği olarak seçilecek mikroorganizmaların insan orijinli olması gerekmektedir. Ayrıca probiyotik bakteri gerek besin için gerekse de adsorbe olmaları yüzey için rekabet etmelidirler. Oral probiyotik olarak kullanılan bakteriler Tablo2.1 ` de verilmiştir.

**Tablo 2.1.**Probiyotik olarak kullanılan bakteriler.

<i>Lactobacillus</i> suşları	<i>Bifidobacterium</i> suşları	<i>Streptococcus</i> suşları
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>S. thermophilus</i>
<i>L.casei</i>	<i>B. breve</i>	
<i>L. bulgaricus</i>	<i>B.lactis</i>	<b>Weissella suşları</b>
<i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	<i>B.longum</i>	<i>W.cibari</i>
<i>L. johnsonii</i>	<i>B. adolescentis</i>	
<i>L.paracasei</i>	<i>B. infantis</i>	<b>Lactococcus suşları</b>
<i>L. plantarum</i>		<i>L. lactis</i>
<i>L.reuteri</i>		
<i>L. rhamnosus</i>		<b>Propionibacterium suşları</b>
<i>L. salivarius</i>		<i>P. Freudenreichii subsp. shermanii</i>

Probiyotik bakterilerin diş çürüğünü önleme veya yavaşlatmada yararlı olabilmesi için; ağız dokularına tutunabilmeli, patojen bakterilerin yerleşim yerlerine yerleşerek biyofilmin bir parçası olmalıdır. Ağız patojenlerine karşı antimikrobiyal madde üretmeli ve patojen bakterilerin çoğalmasını engellemelidir. Ağız içerisinde oluşabilecek düşük pH değerlerine karşı dayanıklı olmalı, pH'yı düşürmemelidir. Gıdalardaki şekeri metabolize ettiğinde, asit üretimi düşük olmalı, bağışıklık sistemini olumlu etkilemelidir (Şekil 2.3) (149).

Konak, patojen bakteri, besinler ve zaman faktörleri hep birlikte ağızda organik asit üretimine ve sonrasındaki demineralizasyona neden olmaktadır. Buna göre hastalık sürecine engel olmak için bu faktörlerden en az birinin elimine edilmesi yeterli olabilir.



Şekil 2.4. Oral probiyotiklerin potansiyel etkileri

#### 2.4.1. Probiyotiklerin Diş Çürüğüne Etkisi

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda probiyotiklerin uygulanması için sakız, gargara, pastil, çikolata, süt, peynir, yoğurt gibi ürünler kullanılmıştır. Bu taşıyıcı sistemlerin bazı sınırlayıcı yönleri vardır. Örneğin gıdalarla alınan probiyotikler oral kaviteden hızla kaybolurlar. Buda probiyotiklerin etkinliğini azaltır (145, 151). Nase ve ark( 151), invivo çalışmada diyeteye ilave edilen *L.rhamnosus* GG 'nin *S. sobrinus*'u inhibe ederek diş

çürümesini engellediğini bildirmiştir. *L.rhamnosus* homofermantatif bir bakteri olup sükröz ve laktozu fermente edemediğinden karyojenik olmadığı kabul edilmektedir (Tablo 2.2 ).

**Tablo 2.2.** Probiyotikler ve uygulama örnekleri

Probiyotik	Preparat	Etki	Kaynak
<i>L. rhamnosus</i> SD11 (1050 cfu/L) <i>L. bulgaricus</i>	Fermente süt 4 hafta	<i>S.mutans</i> sayısında azalma	152
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB-12 ( $10^{10}$ kob/mL)	Yavaş salınımlı tablet veya günde 2 kaşık 22–23ay	Gruplar arasında farklılık yok	153
<i>Bifidobacterium lactis</i> Bb-12 ATCC27536 and <i>Lactobacillus</i> <i>acidophilus</i> La-5 ( $10^6$ kob/g)	Dondurma/10 gün	<i>S. mutans</i> sayısında azalma	154
<i>L.rhamnosus</i> GG ( $2 \times 10^8$ kob/mL)	Yoğurt /3 hafta	<i>S. mutans</i> sayısında azalma	155
<i>L.rhamnosus</i> , <i>Bifidobacterium</i> <i>longum</i> , <i>Saccharomyces</i> <i>cereviasae</i> ( $1.25 \times 10^6$ kob/mL) <i>Bacillus coagulans</i> ( $1.5 \times 10^8$ kob/mL)	Suda çözünen toz ağız çalkalama solusyonu	<i>S. mutans</i> sayısında azalma	156
<i>L.rhamnosus</i> LB21 ( $10^7$ kob/mL)	Süt/2 hafta	Gruplar arasında farklılık yok	157
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> DN 173010 ( $2 \times 10^8$ kob/g)	Yoğurt /2 hafta	<i>S. mutans</i> sayısında azalma	158
<i>L. rhamnosus</i> LB21 ( $10^7$ kob/mL)	Süt/21 ay	Gruplar arasında farklılık yok	159
<i>L.rhamnosus</i> GG, ATCC 53103 ( $5-10 \times 10^5$ kob/mL)	Süt/7ay	<i>S. mutans</i> sayısında azalma	160
<i>L.rhamnosus</i> GG ATCC 53103 ( $1.9 \times 10^7$ kob/g) <i>L. rhamnosus</i> LC 705 ( $1.2 \times 10^7$ kob/g)	Peynir/günde 5 kez 3 hafta	Gruplar arasında farklılık yok	161

Probiyotiklerin diş çürüğünü sınırlamada veya önlemede faydalı bir etkiye sahip olabilmesi için, diş yüzeylerine yapışabilmeli ve biyofilm oluşturan bakteriyel topluluklara entegre olabilmelidir. Aynı zamanda karyojenik bakterilerle rekabet etmeli ve onlara antagonistik etki göstererek çoğalmasını önlemelidir (159). Ayrıca gıdalardaki şekerlerin probiyotikler tarafından metabolize edilmesi, düşük asit üretimiyle sonuçlanacaktır.

Probiyotiklerin süt ürünlerine dahil edilmesinin avantajı asidik koşulları nötralize etme kapasitesindedir. Peynir demineralizasyonu önler ve remineralizasyonu destekler. İnvitro bir çalışmada laktobasillerin hidroksiapatite ve epitelyal hücrelere yapışabildiği gösterilmiştir (160). Yapılan çalışmalarda probiyotik laktobasil veya bifidobakterileri içeren ürünlerin tüketilmesinin tükürükte mutans streptokokların sayısını azaltabileceği bildirilmesine karşın ( 141, 151, 158, 161, 164-168) bütün çalışmalarda benzer sonuçlar elde edilmemiştir (157, 159, 169 ). Çalışmalara bakıldığında tükürük içindeki *S.mutans* sayısındaki azalmanın kullanılan mikroorganizma veya gıdaya bağlı olmadığı görülmektedir (Tablo 2.2 ). Yapılan çalışmaların birçoğunda tükürükteki laktobasil sayısındaki değişim belirlenmiştir. Kısa bir süre probiyotik içeren peynir tüketenlerde laktobasil sayısında artış saptanmıştır (161). Laktobasiller de artış Montalto ve ark (169) tarafından da saptanmıştır. Bazı probiyotik *Lactobacillus* ve *Streptococcus* suşlarını içeren ürünler aktif olarak kullanıldıkları süre boyunca bazı kişilerin ağız boşluğunda kolonize oldukları söylenebilir. Ancak bu durum probiyotik suşlara, kullanılan ürüne ve konakçıya göre değişiklik gösterebilmektedir. *L.rhamnosus* GG ve iki farklı *L.reuteri* suşunun ağızda kolonize ettiği, gönüllülerde yapılan çalışmada ağızda kolonize oldukları bildirilmiştir (170, 171, 143). *S. salivarius* K12'nin de ürünün kullanımından kısa bir süre sonra kolonize olduğu belirlenmiştir (172). İnvitro yapılan çalışmada 13 laktobasil suşunun da değişen oranlarda hidroksiapatite yapıştığı saptanmıştır (173).

İnvitro bir çalışmada *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium lactis* Bb12' nin hidroksiapatit üzerinde oluşan pelikül üzerindeki tükürük bileşimini etkileyerek *S.mutans*'ın yapışmasını engellediği gözlenmiştir (170, 171, 174, 175).

#### **2.4.2. Probiyotiklerin Diş Plağına Etkisi**

Diş plağına etkilerini de direk ve indirek etkileşim olarak iki grupta incelenir. Direk etkileşimleri muhtemelen, konakçı dokularında ve diğer bakterilerdeki bağlanma alanları için rekabet ve besin maddeleri için rekabet yoluyla plağın biyofilm oluşumunun bozulmasına

neden olurlar. Oral patojen bakterileri inhibe eden antimikrobiyal bileşiklerin üretimi de önemli bir mekanizmadır. Laktik asit bakterilerinin organik olmayan antimikrobiyal ajanlar üreterek de plak oluşumunu engelleyebilirler (20, 176, 177). Probiyotik bakteriler, immün sistemi ve mukozal geçirgenliği regüle ederek indirek olarak biyofilm oluşumunu engellemektedirler (20, 177, 178).



### 3. MATERYAL VE YÖNTEMLER

Bu in-vitro çalışmada probiyotik bakterilerin, 8 farklı restoratif materyal ve standart hidroksiapatit disklerin yüzeyinde patojen biyofilm oluşması üzerine etkileri, mikrobiyolojik deneyler ve SEM analizleri ile incelenmiştir.

#### 3.1 Çalışmada Kullanılan Materyaller

Çalışmada kullanılan kompozit rezin materyaller, içerikleri, üretici firmaların isimleri tablo 3.1’de, cam iyonmer materyalin içeriği, üretici firma ismi Tablo 3.2 ‘de, CAD-CAM bloklar, içerikleri, üretici firmaları Tablo 3.3’te ve standart hidroksiapatit diskin içerik ve üretici firması Tablo3. 4’te verilmistir.

**Tablo 3.1.** Kompozit rezinlerin içerikleri ve üretici firmaları.

Materyal	Türü	İçerik	Partikül boyutu	Doldurucu oranı (hacimce)	Doldurucu oranı (ağırlıkça)	Üretici Firma
Aelite all purpose body	mikrohibrit	Bis-EMA, TEGDMA,	0.04-0.7µm cam doldurucu, amorf silika	%55	%76	Bisco, schauburg IL, USA Lot 1500005536
G-gænial	mikrohibrit	UDMA, Dimethacrylate co-monomer	16-17 µm Strontiyum-Lanthanoid fluoride,silika 850 nm cam doldurucu, 16nm silika, fumed silika	%62	%76	GC Dental Products Corp., Aichi, Japan Lot 1502191
Clearfil majesity ES-2	nanofil	BisGMA,TEGDMA, hidrofobik, aromatik , dimetakrilat, silane, cam seramik, mikrodoldurucu alümina	1.5µ-20nm silanated barium cam doldurucu	%40	%78	Kuraray, Japonya Lot BK0010
Beautiful II	nanohibrit	Bis-GMA TEGDMA, UDMA	0,1-4 µm Mean 0.8 µm S-PRG, multifunctional Alumino uoro-borosilicate glass	%68	%83	Shofu Co, Kyoto, Japan Lot 101472
Sonic fill-2	Bulk fill	Bis-EMA, TEGDMA	Silikon dioksit cam oksit, , ytterbium trifluoride	%81.3	unreported	Kerr corporation, orange, ca, usa Lot 4959170

**Tablo 3.2.** Cam iyonomer Siman içeriği ve üretici firması.

Materyal	Türü	İçerik	Üretici Firma
Equia Forte	Restoratif Cam iyonomer Siman	<b>Toz:</b> Floro-alumino-silikat cam , Poliakrilik asit tozr, Pigment <b>Sıvı:</b> Poliakrilik asit, distile su, karboksilik asit	GC Dental, Tokyo, Japan Lot 161121A

**Tablo 3.3.** CAD-CAM Blokların içerikleri ve üretici firmaları.

Materyal	Türü	İçerik	Partikül boyutu	Doldurucu oranı (ağırlıkça)	Üretici Firma
Lava Ultimate	Kompozit rezin nanoseramik	Bis-GMA, UDMA, Bis-EMA, TEGDMA  Seramik (%80) Rezine (%20)	20 nm (nanometre) silika dolgu, kümeleşmemiş 4-11 nm zirkonya dolgu ve kümeleşmiş zirkonya/silika dolgu	% 80	(3M ESPE, Seefeld, Germany) Lot N666578
Emax IPS	Cam seramik	Lityum disilikatla güçlendirilmiş cam seramik	SiO <sub>2</sub> , LiO, K <sub>2</sub> O, P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> , ZrO <sub>2</sub> , ZnO, diğer oksitler, renk oksitleri		(Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein) Lot V01944

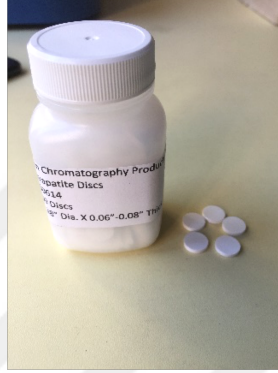
**Tablo 3.4.** Hidroksiapatit içeriği ve üretici firması.

Materyal	İçerik	Üretici Firma
Hidroksiapatit	Kalsiyum/fosfat (1.67) Ca <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub>	Clarkson Chromatography Products, Williamsport



### 3.1.1 Hidroksiapatit örneklerin hazırlanması

Hazır steril şekilde bulunan 9,7 mm çapında, 1,5 mm kalınlığındaki standart hidroksiapatit örnekler satın alınarak biyofilm çalışmalarında herhangi bir cila işlemi uygulanmadan kullanılmıştır. (Clarkson Chromatography Products, Williamsport, PA, USA) (Resim 3.1).



**Resim 3.1.** Hidroksiapatit

### 3.1.2 Kompozit rezin örneklerin hazırlanması

Kompozit örnekler G-gænial (GC) (Resim 3.2), Clearfil majesity ES 2 (Kuraray) (Resim 3.3), Beautiful II (Shofu) (Resim 3.4), Ælite all purpose all body (Bisco) (Resim 3.5) ve Sonic fill 2 (Kerr) (Resim 3.6), 10 mm çapında 2 mm kalınlığında politetrafloroetilen (teflon) kalıplarda (Resim 3.7) her birinden A1 renginde kompozit rezinler 2 mm kalınlığında yerleştirilip üzerine cam lameller ile basınç uygulandıktan sonra ışık aleti (GC D-Light Duo LED Curing Light , Japan)(Resim 3.8) ile 10 sn polimerize edildi. Daha sonra örneklerin diğer tarafından ek 10 sn ışık verildi.



**Resim 3.2.** G-aenial A1 (GC)



**Resim 3.3.** Clearfil majesity ES 2 A1 (Kurarary)



**Resim 3.4.** Beautiful II A1 (Shofu)



**Resim 3.5.** Ælite all purpose all body A1 (Bisco)



**Resim 3.6.** Sonic Fill 2 A1 (Kerr)



**Resim 3.7.** Politetrafloroetilen kalıp (teflon)



**Resim 3.8.** Işık aleti

24 saat distile suda etüvde (Sanyo,Japan) (Resim 3.9) oda sıcaklığında bekletildi.



**Resim 3.9.** Etüv

Etüvden çıkarılan örnekler cila makinası (Buehler, Amerika)(resim 3.10) su soğutması altında sırası ile 600, 1200, 1600, 2000 gritlik (Silicon carbide grinding paper, Buehler, Amerika)(resim 3.11) kağıt zımparalar ile işleme tabi tutulduktan sonra, 1 $\mu$ m 'lik cila patı ( Monocrystalline Diamond Suspension, Buehler, Amerika) (resim 3.12) ve keçe (Buehler,Amerika)( resim 3.13) ile cila işlemi tamamlandı.



**Resim 3.10.** Zımpara cilası



**Resim 3.11.** Zımparalar



**Resim 3.12.** Cila patı



**Resim 3.13.** Keçe

### **3.1.3 Cam İyonomer örneklerin hazırlanması**

Kapsül formunda bulunan Cam iyonomer simanlar ( Equia Forte , A2 ) (resim 3.14) vibratör ile (Silamat S5, Vivadent, Amerika) (resim 3.15) 10 sn karıştırıldıktan sonra kapsül tabancasına ( GC capsule applicator, Japan)( resim 3.16) yerleştirilip altına mylar strip konan 10 mm çap 2 mm yüksekliğinde politetrafloroetilen ( teflon ) kalıplara yerleştirilip üzerine yine mylar strip ve cam lameller ile basınç uygulandıktan sonra sertleşmesi için 2 dk 30 sn beklendi. Sertleşmesi tamamlanan örneklere prospektüse uygun olarak cila yapılmayıp iki yüzüne de yüzey örtücü (Equia Forte Coat, Japan) (resim 3.17) uygulandıktan sonra ışık aleti (GC D-Light Duo LED Curing Light , Japan ) ile 20 sn polimerize edildi.



**Resim 3.14.** Equia Forte A2



**Resim 3.15.** Equia Forte Coat



**Resim 3.16.** Karıştırıcı



**Resim 3.17.** Kapsül tabancası

### 3.1.3. CAD /CAM bloklarda örneklerin hazırlanması

CAD/CAM bloklarından (Emax ve Lava) (Resim 3.18 ve 3.19) örnek hazırlamak için Bloklar Cerec 4 ( sirona, İtalya ) CAD/CAM sisteminde (Resim 3.20) 10 mm çapında silindir haline getirildikten sonra kesit alma cihazında (Izomet Buehler, Ltd, Lake Bluff, II, ABD) (Resim 3.21) 2mm kalınlığında kesilerek disk şeklinde örnekler hazırlandı.

Emax ile hazırlanan örnekler üretici firmanın önerileri doğrultusunda sinterleme makinesinde programat PS10 (Ivoclar Vivadent, Amerika) (Resim 3.22 ve 3.23) sinterize edildi.

Emax ve Lava ile hazırlanan örnekler mekanik cila makinasında su soğutması altında sırası ile 600, 1200, 1600, 2000 grit zımparalar ile cilası yapılarak 1µm'lik cila patı ve keçe ile cila işlemi sonlandırıldı.



**Resim 3.18.** Emax bloklar



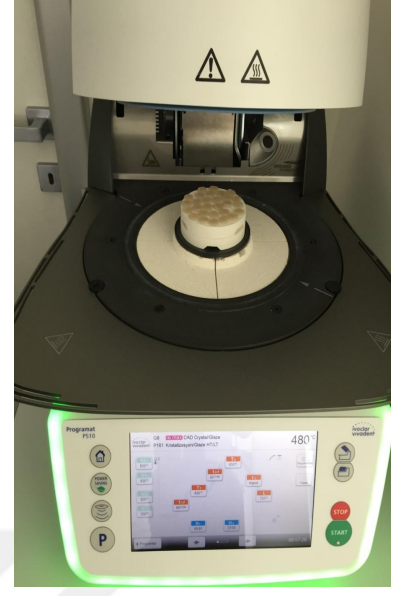
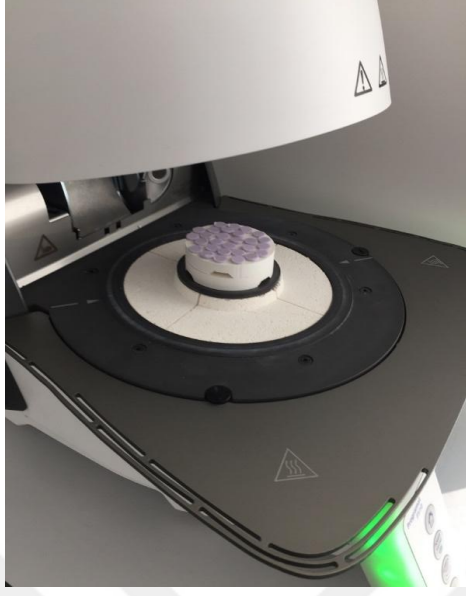
**Resim 3.19.** Lava bloklar



**Resim 3.20.** Cerec 4



**Resim 3.21.** Kesit alma cihazı



**Resim 3.22.** Programat PS10 cihazında emax örneklerin sinterize edilme öncesi ve sonrası.

Hazırlanan bütün örnekler temizlenmeleri için 5 dk ultrasonik su havuzunda bekletilip kurutuldular. Hazırlanan restoratif materyal örnekleri yıkayıp kurutulduktan sonra yüzey profilometresi ile (Mahr) 3 ayrı noktadan yüzey pürüzlülüğün Ra değerleri ölçüldü ve bu 3 değerın ortalaması alındı.



**Resim 3.23.** Yüzey Profilometresi



Yüzey pürüzlülüğü ölçülen örnekler, mikrobiyolojik çalışmada steril olarak kullanılacağı için, önce distile su ile yıkandıktan sonra otoklavda 121 derecede 15 dakika steril edildi.

### **3.2. Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmalar**

Çalışmada kullanılan bakteriler Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Mikrobiyoloji biriminden sağlanarak çalışmalarda kullanılmıştır. Bu bakteriler daha önce yapılan çalışmalardan izole edilerek -86°C`de stoklanmıştır. Bu amaçla 15 adet bakteri seçilmiştir. Bunlardan 4'ü oral laktik asit bakterisi 11' i ise oral patojen bakteri olarak ön çalışmalara alınmıştır.

### **3.3. Tükürük Hazırlanması**

Tükürük örneği 2 ay öncesine kadar herhangi bir antibiyotik ve probiyotikli ürün kullanmamış olan ve sistemik bir hastalığı olmayan 20-30 yaş arasındaki kişilerden yemekten en az bir saat sonra ve günün aynı saatinde stimüle edilmemiş 5 ml taze tükürük falkon tüpünde toplanmıştır. Falkon tüpü 4°C 10.000 rpm'de 30 dk santrifüj edilmiştir. Daha sonra 56°C'de 30 dk su banyosunda bekletilmiştir. Üst faz şırıngayla çekilmiş ve 0.22'lik filtreden geçirilerek kullanılmıştır.

### 3.4 Çalışmada Kullanılan Besi Yerleri ve Kimyasallar

**MRS AGAR** ( Lactobacillus Agar acc. DE MAN, ROGOSA and SHARPE (MRS) agar (Oxoid)).

Peptone casein 10,0 g/L

Meat ekstrakt 10,0 g/L

Yeast ekstrakt 4,0 g/L

D(+) Glucose 20,0 g/L

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,0 g/L

Tween 80 1,0 g/L

Di-Ammonium hydrogen citrate 2,0 g/L

Sodium acetate 5,0 g/L

MgSO<sub>4</sub> 0,2 g/L

MnSO<sub>4</sub> 0,04 g/L

Agar-agar 14,0 g/L

68,2 g/L olacak şekilde tartılan toz halindeki besiyeri distile su içinde karıştırılmış ve otoklavda 121° C 15 dakika sterilize edilerek ve steril petrilere dökülmüştür.

#### **M17 Katı Besi Yeri**

Peptone from soymeal 5,0 g/L

Peptone from meat 2,5 g/L

Peptone from casein 2,5 g/L

Yeast ekstrakt 2,5 g/L

Meat Ekstrakt 5,0 g/L

Lactose mono-hydrate 5,0 g/L

Ascorbic acid 0,5 g/L

Sodium β-glycerophosphate 19,0 g/L

Magnesium sulfate 0,25 g/L

Agar-agar 12,75 g/L

Agarlı besiyeri 55,0 g/L olacak şekilde distile su içinde eritip 121°C 15 dakika sterilize edilerek kullanılmıştır.

### **Mitis Salivarius Katı Besi Yeri**

Casein enzymatic hydrolysate, 15.0 g/L

Crystal violet, 0.0008 g/L

Dextrose, 1.0 g/L

Dipotassium phosphate, 4.0 g/L

Peptic digest of animal tissue, 5.0 g/L

Sucrose, 50.0 g/L

Trypan blue, 0.075 g/L

Agar, 15.0 g/L.

Agarlı besiyeri 90,0g/L olacak şekilde distile su içinde ısıtılarak eritilir, otoklavda 121° C 15 dakika sterilize edilir ve steril petri kutularına dökülmüştür.

### **Brain Heart İnfüzyon Sıvı Besi Yeri (BHI)**

Nutrient Substrate (beyin ekstraktı, kalp ekstraktı ve peptonlar) 27,5 g/L

D(+) Glucose 2,0 g/L

NaCl 5,0 g/L

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,5 g/L

Besiyeri 37,0 g/L olacak şekilde distile su içinde eritilerek tüplere dağıtılmış ve 121°C 15 dakika sterilize edilmiştir.

### **Brain Heart İnfüzyon Katı Besiyeri (BHI)**

Nutrient substrate (beyin ekstraktı, kalp ekstraktı ve peptonlar) 27,5 g/L

D(+) Glucose 2,0 g/L

NaCl 5,0 g/L

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,5 g/L

Agar-agar 15,0 g/L

Besiyeri 52,0 g/L olacak şekilde distile su içinde ısıtılarak eritilir, otoklavda 121°C 15 dakika sterilize edilerek kullanılmıştır.

### **Kongo Kırmızısı Agar**

Beyin kalp infüzyon buyyon 37g/L

Sükroz 50 g/L ,

Kongo kırmızısı 0.8 g/L

Agar 10g/L

Sükroz hariç diğer maddeler distile su içinde ısıtılarak eritilerek otoklavda 121°C 15 dakika sterilize edildikten sonra sükroz filtreden geçirilerek besiyerine ilave edilerek karıştırıldıktan sonra kullanılmıştır.

### **Kanlı Katı Besi Yeri**

Nutrient substrate kalp ekstraktı ve peptonlar) 20,0 g/L;

NaCl 5,0 g/L;

Agar-agar 15,0 g/L

İçeren hazır steril petri kutuları içindeki agar kullanılmıştır.

### **Kristal Viyole Solüsyonu**

Kristal viyole 2 gr

Etil alkol 20 gr

Amonyum oksalat 0.8 gr

Distile su 80 ml

Maddeler distile su içinde çözülerek kullanılmıştır.

### **Cacodylate tampon**

0.2 M cacodylate tamponu hazırlamak için 2,143 gram sodyum cacodylate tartılmış ve 50 ml'de çözülmüştür. 0.1M hazırlamak için ise hazırlanan 0,2 M cacodylate tamponu yarı yarıya sulandırılarak 0.1M cacodylate buffer hazırlanmıştır. Bunun için 25 ml 0.2 M cacodylate buffer'dan alınıp 25 ml distile su ilave edilmiştir.

%2.5'luk glutaraldehide 0,1 M cacodylate buffer içinde hazırlanmıştır.

%1'lik osmium tetroksit 0.1 M cacodylate buffer içinde hazırlanmıştır. 0.1 gr OsO<sub>4</sub> üzerine 10 ml cacodylate buffer eklenmiştir.

Cacodylate tamponunun pH aralığı 6.4-7.4 aralığında ve aynı zamanda son konsantrasyon 0.1 M olması gerekmektedir.

### **Alkol serisinin hazırlanması**

Alkol Serileri için %30, 50, 70,90 ve 100'lük alkol hazırlanmıştır ve Tablo 3.5 de verilmiştir. Her bir seri için 50 ml hazırlanmıştır.

**Tablo 3.5.** Alkol serilerin için gerekli alkol ve distile su miktarları

<b>Alkol serileri</b>	<b>%100 alkol</b>	<b>Distile su</b>
%30'luk için	15 ml	35 ml
%50'lik için	25 ml	25 ml
% 70'lik için	35 ml	15 ml
% 90'lık için	45 ml	5 ml
% 100'lük için	50 ml	.....

### **Kullanılan diğer kimyasallar ve besi ortamları**

Glukoz (Merck), NaCl (Merck, Almanya), HCl (Merck), NaOH (Merck), glasiyal asetik asit (Merck), kristal viyole (Merck), lugol (Merck), etil alkol (Merck), bazik fuksin

(Merck), kanlı agar, oksidaz kitleri (Merck), API CHL 50 ve APİ Strep 20 kitleri (BioMerieux), katalaz (Sigma) kullanılmıştır.

### **3.5. Seçilen İzolatların Morfolojik ve Biyokimyasal Özelliklerine Göre Tanımlanması**

Stok kültürden alınan bakteriler MRS broth, M17 broth ve Brain heart infüzyon broth içine ekim yapılmış ve 24-48saat % 10 CO<sub>2</sub> içeren anaerobik koşullarda inkübe edilmiştir. Daha sonra buradan MRS agar, M17 agar, Mitis salivarius agar ve kanlı agara ekim yapılarak saflıkları kontrol edilmiştir. Aktifleştirilen kültürler uygun besiyerlerine ekilerek koloni morfolojileri kontrol edilerek Gram boyama yapılmıştır. Daha sonra kültürlerin özelliklerini belirlemek amacı ile oksidaz ve katalaz testleri yapılmıştır. Kanlı agara ekilerek hemoliz özellikleri gözlenmiştir. Karbonhidrat fermantasyon testi, Laktik asit bakterileri için Api CHL 50 ile streptokoklar için ise Api 20 ile üretici firmanın talimatları doğrultusunda yapılmıştır. Çalışma için seçilen suşların tanımlaması 16S rRNA dizi analizi ile yapılmıştır.

#### **3.5.1. Gram boyama**

Preparatlar 18 – 24 saatlik taze kültürlerden hazırlanmıştır. Temiz bir lam üzerine 1 damla distile su konmuş ve öze ile alınan bakteri kültürü distile su içerisinde dağıtılıp, lam üzerine yayılarak havada kurutulmuştur. Preparat 3 – 4 kez ateşten geçirilerek bakteriler tespit edilmiştir. Hazırlanan preparat üzerine kristal viyole damlatılıp 1 dakika bekletilmiş ve daha sonra lam distile suyla yıkanıp, üzerine lugol damlatılarak 1 dakika bekletilmiş ve lugol dökülerek lam suyla yıkanmıştır. Daha sonra lam 10-15 saniye % 95 'lik alkol ile muamele edildikten sonra tekrar suyla yıkanıp üzerine bazik fuksin boyası damlatılmış ve 30 saniye bekletilmiştir. Süre sonunda preparat suyla yıkanıp, kurutma kağıdıyla kurutularak mikroskopta incelenmiştir. Gram pozitif kontrol örneği olarak *Staphylococcus aureus*, Gram negatif örneği olarak da *Escherichia coli* bakterisi kullanılmıştır. Preparatlar ışık mikroskopunda (Leica DM500) immersiyon yağı kullanılarak 100'lük objektifte incelenmiştir. Mikroskopta mor renge boyanan bakteriler Gram pozitif, pembe renge boyanan bakteriler ise Gram negatif olarak değerlendirilmiştir (179).

### 3.5.2. Katalaz testi

Katalaz testi, hidrojen peroksitin katalaz enzimi yardımıyla su ve oksijene ayrılması temeline dayanan bir testtir. Bu amaçla MRS agar, M17 agar ve mitis salivarius agarda geliştirilmiş kültür örneği lam yüzeyine alınıp üzerine % 3'lük hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) damlatılmıştır. *Staphylococcus aureus* test sırasında pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Gaz çıkışının olduğu kültürler katalaz pozitif, gaz çıkışının olmadığı kültürler ise katalaz negatif olarak değerlendirilmiştir (180).

### 3.5.3. Oksidaz testi

Oksidaz testi, için oksidaz kitleri (Merck) kullanılmıştır. Kit protokolüne göre, bakteri kültürleri, MRS, M17 agarda ve mitis salivarius agarda geliştirildikten sonra steril kürdan yardımıyla alınan bakteri örneği oksidaz striplerinin üzerine yayılmış ve 20 – 60 saniye beklenmiştir. Süre sonunda Mavi – mor rengin gözlenmesi oksidaz pozitif, rengin değişmemesi oksidaz negatif olarak yorumlanmıştır. *Staphylococcus aureus* test sırasında pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

### 3.5.4. Hemolitik aktivite tayini

Test mikroorganizmalarının hemolitik aktivite varlığının belirlenmesi amacıyla, aktiveleştirilen kültürler kanlı agara ekilmiş ve %5 CO<sub>2</sub> ortamında 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası, koloni çevresinde ışığı geçiren şeffaf zon varlığı beta hemolitik, koyu yeşil üreme varlığı alfa hemolitik, zon oluşmaması ise non - hemolitik olarak değerlendirilmiştir (181).

### 3.5.5. Test İzolatlarının API CHL 50 ve API Strep 20 ile karbonhidratları kullanma durumlarının belirlenmesi

Laktik asit bakterilerinin API CHL 50 ile Streptokokların ise API 20 Strep (bioMerieux) test kitleri ile bazı biyokimyasal özellikleri yönetici talimatları doğrultusunda belirlenmiştir. Bu amaçla, MRS agar da, %5 CO<sub>2</sub> ortamında 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakılan kültürlerden, eküvyon yardımıyla 2 ml'lik API süspansiyon ortamına aktarılmıştır.

2 ml'lik API süspansiyon ortamında maksimum yoğunluk elde edildikten sonra ortam sıvısından 5 ml'lik API süspansiyon ortamına aktarılmış ve bu ortamda BioMerieux Mc. Farland 2 yoğunluğunu sağlayan sıvı miktarı tespit edilmiştir. Daha sonra 2 ml'lik API süspansiyon ortamından BioMerieux Mc.Farland 2 yoğunluğunu sağlayan sıvı miktarının iki katı alınmış ve 10 ml API CHL50 ortamına aktarılarak karıştırılmıştır. Elde edilen süspansiyon vortekslendikten sonra, kuyucuklara aktarılarak üzeri mineral yağ ile kaplanıp, 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun 24. ve 48. saatlerinde kuyucuklarda meydana gelen renk değişimleri kaydedilmiştir. Koyu mavi renkte olan kuyucukların sarı renge dönmesi pozitif, değişmeden kalması negatif olarak değerlendirilmiştir. İzolatların renk değişim sonuçları kaydedildikten sonra, yönetici firma tarafından optimize edilmiş veri tabanında türleri belirlenmiştir. API CHL 50 testinde bulunanlar şunlardır: gliserol, eritritol, D-arabinoz, L-arabinoz, riboz, D-ksiloz, L-ksiloz, adonitol, inositol, galaktoz, glukoz, fruktoz, mannoz, sorboz, rhamnoz, dulsitol, salisin, sellobioz, maltoz, laktoz, melibioz, sukroz, trehaloz, inulin, melezitose, rafinoz, nişasta, glikojen, ksilitol, gentiobiose, D-turanoz, D-lyxose, D-tagatoz, eskulin,  $\alpha$ -metil-D-mannosid,  $\alpha$ -metil-Dglukozid, N-asetilglukozamin, amigidalin, arbutin, D-arabitol, L-arabitol, glukonat, 2-keto-glukonat, 5-keto glukonat, mannitol, sorbitol, D-fukoz, L-fukoz, b-metil-D-ksilosid.

API 20 Strep kitlerinde ise Mc.Farland 4 yoğunluğuna göre bakteri sayısı ayarlanarak kuyucuklara aktarılmış ve karbonhidratları içeren kuyucukların üzeri mineral yağ ile kaplandıktan sonra 37°C de 4 saat inkübe edildikten sonra enzim testleri gerekli reaktifler damlatılarak değerlendirilmiştir. Karbonhidratlar ise 24 saat inkübasyondan sonra değerlendirilmiştir. API 20 Strep testinde bulunanlar şunlardır: sodyum pruvat, hippurik asit, esculin, piroglutamikasitbetanastilamid,  $\alpha$ -galaktosidaz,  $\alpha$ -galaktosidaz, alkalın fosfataz, losin amino peptidaz, arjinin dihidrolaz, D-riboz, L-arabinoz, Dmannitol, D-sorbitol, D-laktoz, L-arabinoz, D-mannitol, D-sorbitol, D-laktoz, Dtrehaloz, inulin, D-rafinoz, nişasta, glikojen.

### **3.6. Seçilen izolatlarının 16S rRNA dizi analizi ile genotipik karakterizasyonlarının belirlenmesi**

Seçilen izolatlarının tanımlanması amacıyla 16s rRNA dizi analizi yapılmıştır. İzolatların genomik DNA'sı GeneJET genomik DNA saflaştırma kiti (ThermoFischer Scientific) kullanılarak saflaştırılmıştır. Bu amaçla aşağıda yer alan kit protokolü kullanılmıştır.



- 24 saatlik taze kültür 5000 x g'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant atılmıştır.
- Pelet 180 µL liziz tamponunda (20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, %1,2 Triton X-100, 20 mg/mL lizozim, pH: 8.0) resüspanse edildikten sonra 37°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir.
- 200 µL liziz solüsyonu ve 20 µL Proteinaz K eklenmiş ve vortekslenmiştir. Homojen bir süspansiyon elde edildikten sonra 56°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir.
- 20 µL RNase A solüsyonu eklenmiş, vortekslenerek karıştırıldıktan sonra 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- 400 µL %50 etanol eklenmiş ve vortekslenmiştir.
- Lizat kolona transfer edilmiş ve 6000 x g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.

Koleksiyon tüpündeki sıvı uzaklaştırılmıştır.

- 500 µL yıkama solüsyonu I eklenmiş ve 8000 x g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Koleksiyon tüpündeki sıvı uzaklaştırılmıştır.
- 500 µL yıkama solüsyonu II eklenmiş ve 3 dakika 12000 x g'de santrifüj edilmiştir.
- 50 µL elüsyon tamponu kolonun merkezine eklenmiş, 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 8000 x g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
- Elde edilen DNA -20°C'de saklanmıştır ([www.thermoscientific.com/onebio](http://www.thermoscientific.com/onebio)).

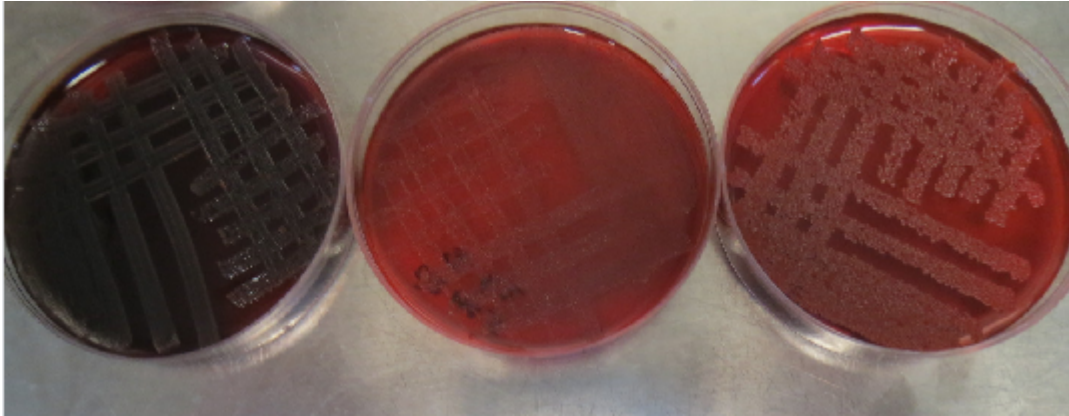
Elde edilen genomik DNA, kalıp DNA olarak kullanılarak 16S rRNA gen bölgesi için PCR kurulmuştur. Bu amaçla 27F 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' ve 1492R 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3' evrensel primerleri kullanılmıştır. Reaksiyon bileşenleri olarak, 10X TaqBuffer (+KCl-MgCl<sub>2</sub>), 2,5 µL; 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 2,5 µL; 2,5 mM dNTP mix, 2,5 µL; 2,5 mM 27F primer, 2,5 µL; 2,5 mM 1492R primer 2,5 µL; Taq polimeraz (5 u/µL), 0,25 µL; nükleaz içermeyen distile su, 11,75 µL; kalıp DNA, 1µL kullanılmıştır. PCR işleminde, ön denatürasyon basamağı 94°C'de 3 dak.; denatürasyon basamağı 94°C'de 30 sn., bağlanma basamağı 55°C'de 1 dak., uzama basamağı 72°C'de 2 dak., 35 döngü; son uzama basamağı ise 72°C'de 5 dak. olarak yapılmıştır (182). İzolatların dizi analizleri, BM Laboratuvar Malzemeleri Sanayi ve Ticaret Limited Şirketi tarafından yapılmıştır. Elde edilen dizi bilgisi BioEdit, dizi hizalama editörü ile düzenlenmiş ve birleştirilmiştir. Dizi analizi sonucunda elde edilen veriler NCBI (National Center for Biotechnology Information) kullanılarak veri bankasındaki dizilerle karşılaştırılarak tür seviyesinde moleküler tanıları saptanmıştır.

### 3.7. İzolatların Biyofilm Oluşturma Özelliklerinin Belirlenmesi

İzolatların biyofilm üretimi, mikrotitrasyon plaka yöntemi (183, 184 ) ve kongo kırmızılı agar (CRA) (185) yöntemi ile belirlenmiştir.

#### 3.7.1. Kongo Kırmızılı Ortamda Biyofilm Oluşumunun Belirlenmesi

İzolatların biyofilm oluşturup oluşturmadığı % 1 sukroz içeren Kongo kırmızısı agarda yapılmıştır. CRA plaklarına ekim yapılarak 37°C de 18-24 saat süre ile % 10 CO<sub>2</sub> içeren anaerobik koşullarda inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda gelişen kültürlerin morfolojik görünüşleri incelenmiştir (Resim 3.24). İzolatlardan siyah renkli koloniler pozitif, renk değiştirmemiş olan sarı renkli koloniler negatif olarak belirlenmiştir (185).



Resim 3. 24. CRA plaklarına ekim ve görüntü.

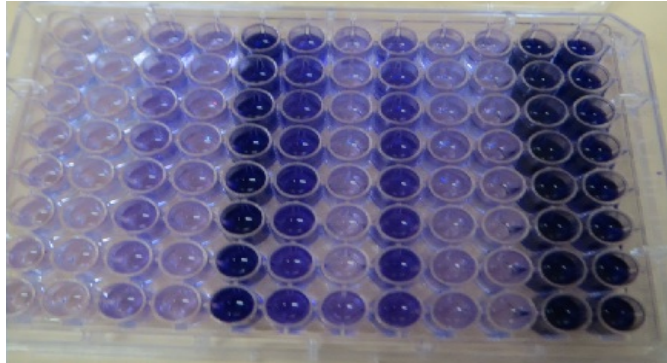
#### 3.7.2. Mikrotitre Plaka Yöntemi ile Test Mikroorganizmalarının Biyofilm Oluşumunun Belirlenmesi

İzolatların biyofilm oluşumu mikrotitre plaka yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Test bakterileri BHI sıvı besiyerine ekilerek 24 saat süre ile % 10 CO<sub>2</sub> içeren anaerobik koşullarda inkübe edilmiştir. 96 kuyucuklu ELİSA petrisine ayrı ayrı %2 glikoz, laktoz, früktoz, galaktoz, rafinoz, maltoz ve sükroz içeren BHI sıvı besiyerinden 195µl olacak şekilde dağıtılmıştır. Her bir kuyucuğa taze kültürden 5 µl bakteri (10<sup>8</sup> kob/mL olan kültürden) ekimi yapılmıştır. Negatif kontrol kuyucuklarına sadece besiyeri konulmuştur.

Örnekler 37°C de %10 CO<sub>2</sub> içeren ortamda 48 saat süre ile inkübasyona tabi tutulmuştur. İnkübasyon süresinin sonunda örnekler spektrofotometre (Shimadzu, UV-2101PC) yardımıyla 470nm dalga boyunda okunmuştur (Resim 3.25 ). Okumadan sonra plaka içerisindeki besi ortamı boşaltılmış ve plaka iki kez steril fosfat tamponlu su (PBS) ile yıkanmıştır. Plaka üzerine %95lik metanolden 200µl aktarılarak 15 dakika bekletilmiştir. Daha sonra plakadaki metanol boşaltılarak plaka 15 dakika süre ile hava ortamında kurumaya bırakılmıştır. Kuyucuklar kuruduktan sonra üzerine 200µl %2'lik kristal viyole boya çözeltisi ilave edilmiş ve 5 dakika bekletilmiş, sonra plaka içerisindeki boya boşaltılarak iki kez PBS ile yıkanmıştır. Sonra her kuyucuğa 160µl % 33'lük (v/v) glasiyel asetik asit ilave edilerek biyofilmin plakadan kaldırılması sağlanmış ve örnekler spektrofotometre 570nm dalga boyunda okunmuştur ( 183, 184) (Resim 3.26). Deneyler 8 tekrarlı olarak yapılmıştır.



**Resim 3.25.** Spektrofotometre (Shimadzu, UV-2101PC)



**Resim 3.26.** 96 kuyucuklu mikrotitrasyon plakaları biyofilm oluşumlarının belirlenmesi

### 3.8. Seçilen izolatlarının antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi

Test bakterilerinin antibiyotiklere karşı duyarlılıkları Kirby - Bauer Disk Difüzyon Yöntemi ile belirlenmiştir. Tetrasiklin (TE 30 µg), imipenem (IPM 10 µg), kanamisin (K 30 µg), vankomisin (VA 30 µg), ampisilin (AM 10 µg), eritromisin (E 15 µg), gentamisin (CN 10µg) , klindamisin (DA 2 µg), metronidazol (MET 5 µg), okzasilin (OX 1 µg), linezolit (LNZ 30 µg ), streptomisin (S 10 µg), sefolatin (KF 30 µg ),kloramfenikol (C 30 µg)amikasin (AK 30 µg), penicilin G(P 10U) ve netilmisin (NET 30 µg) olmak üzere toplam 18 antibiyotik test edilmiştir ( 186 ).

Laktik asit bakterileri MRS agarda, diğer bakteriler kanlı agarda 24-48 saat geliştirilerek %0,85'lik fizyolojik tuzlu su içerisinde Mc Farland 0,5 ( $10^8$  kob/mL) bulanıklığına ayarlanmıştır. Hazırlanan süspansiyondan Mueller Hinton agarlı besiyeri üzerine eküvyonla tüm yüzeye ekim yapılmıştır. Ekim yapılan petriyerler 15 dakika kuruması amacıyla bekletilmiştir. Daha sonra aseptik koşullarda antibiyotik diskleri agar üzerine petri kenarından 1,5 cm ve her bir disk arasında 2 cm boşluk olacak şekilde yerleştirilmiştir. Disklerin yerleştirilmesi sonrasında petriyerler 15 dakika bekletildikten sonra, örnekler 37°C de %10 CO<sub>2</sub> içeren ortamda 24- 48 saat süre ile inkübasyona tabi tutulmuştur. İnkübasyon sonrasında, disklerin çevresinde oluşan zon çapları cetvelle ölçülerek kaydedilmiş ve sonuçlar değerlendirilmiştir. Deney, çift paralel olarak yapılmıştır (187).

### 3.9. Antibakteriyal aktivite tayini

LAB antimikrobiyal aktivitesi sandviç overlayer ve agar difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir.

Sandviç overlayer yöntemde, MRS broth içerisinde %5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda 37°C de 48saat geliştirilen LAB kültürlerinden 10 µl alınarak daha önceden hazırlanmış ve yüzeyi kurumuş olan MRS agar petriyerlerine damlatılmıştır. Damlatma işlemi tamamlanan petriyerler 48 saat süreyle, 37 °C' de, %5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda inkübe edilmiştir. Gelişen kültürler üzerine test mikroorganizmaları eklenmiştir.

Patojen test mikroorganizmalarının ilavesi için; her bir mikroorganizma için, %7 oranında agar içeren Beyin-Kalp infüzyon yumuşak agar tüpleri hazırlanmıştır. BHI içerisinde gecelik kültürleri hazırlanan test mikroorganizmalarının yoğunluğu Mc Farland

No: 0,5 ( $10^8$  kob/ml) bulanıklığına göre ayarlandıktan sonra kültürden %1 oranında alınarak 45 °C' ye kadar soğutulmuş olan BHI yumuşak agar içerisine inokülasyon yapılmış ve besi yeri iyice karıştırıldıktan sonra MRS agar petrilerinin yüzeyi bakteriyi içeren yumuşak agar (yaklaşık olarak 5–6 ml yumuşak agar ilavesi) ile kaplanmıştır. Petriler %5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda 37°C de 48saat süreyle inkübasyona tabi tutulduktan sonra, sonuçlar; laktik asit bakterileri etrafında oluşan zonların çapları ölçülerek değerlendirilmiştir. Çalışma her izolat için çift paralel olarak gerçekleştirilmiştir (188).

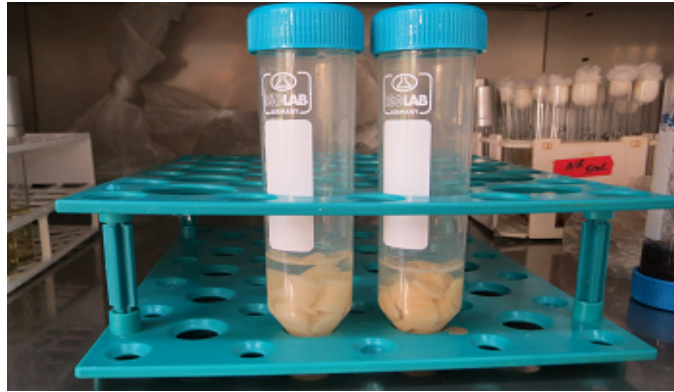
Agar difüzyon yönteminde ise LAB'leri MRS ve M17 broth ortamında 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası MRS ve M17 broth ortamına %1'lik ekimleri yapıp tekrar inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında LAB'leri 5000 rpm.'de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant kısımlarının pH' sı  $5,5 \pm 0,2$  'ye ayarlanarak 0.22µm'lik membran filtrelerden geçirilmiştir. Patojen bakteri izolatları ise BHI sıvı besiyerinde aktiveleştirilmiştir. Aktif kültürlerin, %0,85'lik fizyolojik tuzlu suda 0,5 McFarland bulanıklığına göre ayarlamaları yapılmıştır. Bulanıklığı ayarlanan patojen kültürden 0,5 mL kültür örneği alınıp, 20 mL Mueller Hinton agar içeren sıcak su banyosunda bekletilen agar içine eklenip, iyice karıştırılıp, dökme plak yöntemiyle petrilere dökülmüş ve agarın donması beklenmiştir. Donan petrilerin yüzeyine steril mantar deliciyle kuyucuklar açılmıştır. Açılan her kuyucuğa LAB süpernatantından 100 µL eklenmiş ve aerob ortamda 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Testin sonucu, filtratların etrafında oluşan zonların çapları ölçülerek değerlendirilmiştir (189, 190). Deney çift paralel olarak yapılmıştır.

### **3.10. Restoratif Materyallerde *S. mutans* 'ın Biyofilm Oluşturması ve *L.rhamnosus* ' un Biyofilm Oluşumu Üzerine Etkisinin Belirlenmesi**

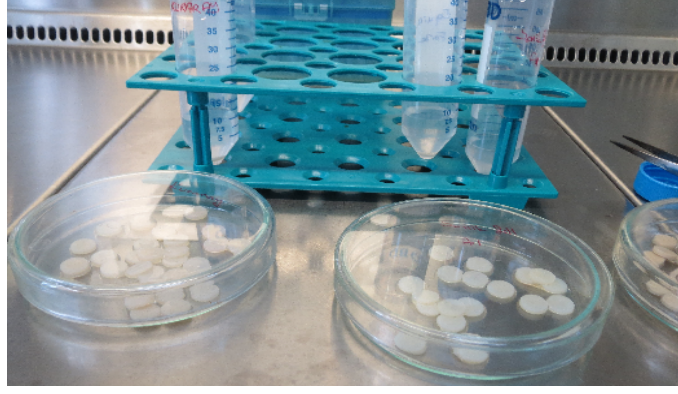
*S. mutans* BHI ve *L.rhamnosus* MRS besiyerine ekilerek %10 CO<sub>2</sub> içeren ortamda 37°C de 48 saat süre ile inkübe edildikten sonra *S. mutans* kanlı agara ve Mitis salivarius agara *L. rhamnosus* MRS agara ekilerek saflık kontrolü yapıldıktan sonra deneylerde kullanılmıştır.

Saf kültürlerden *S.mutans* 1 BHI ve *L.rhamnosus* 12 MRS sıvı besiyerine ekilerek 37°C de %10 CO<sub>2</sub> içeren ortamda 24 saat süre ile inkübe edilerek taze kültürler hazırlanmıştır.

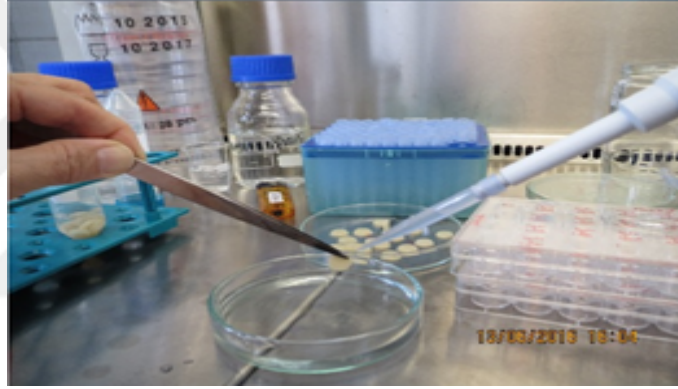
Restoratif materyallerden hazırlanan diskler her bir materyal ayrı falkon tüp içinde hazırlanan tükürük içine yerleştirilerek (Resim 3.27 ) 30 dak süre ile çevrilerek 37  C’ de bekletildikten sonra fizyolojik tuzlu su (FTS) ile yıkanarak 24’ l k polistren plaklarda her göze bir disk olacak şekilde yerleştirilmiştir (Resim 3.28, 3.29, 3.30). Her disk  zerine *S.mutans* 1 kültüründen 10<sup>8</sup> kob/ml olacak şekilde inokule edilmiştir. Bakterilerin tutunması sağlamak için 20 dak. 37  C de tutulmuş ve süre sonunda her kuyucuğa % 1 sükroz içeren BHI besiyerinden 1ml ilave edilmiştir. *L. rhamnosus* 12 içecek kuyucuklara ise % 1 sükroz MRS besiyerinden 1 ml ilave edilerek *L.rhamnosus* 12 kültüründen 10<sup>8</sup> kob/ml olacak şekilde inokule edilmiştir. *S. mutans* 1 ve *L.rhamnosus* 12 içeren kuyucuklarda ise *S.mutans* 1 içeren diskler üzerine 0,5ml % 1 sükroz içeren BHI besiyerinden ilave edilmiştir. Bir grup üzerine 0,5 ml % 1 sukroz içeren MRS besiyeri ilave edilmiştir. Bu kuyucuklara her kuyucukta 10<sup>8</sup> kob/ml olacak şekilde *L.rhamnosus* 12 inokule edilmiştir (Resim 3.31). Diğer grup üzerine ise filtre yerleştirilerek 0,5 ml MRS besiyeri ilave edilmiştir (Resim 3.32, 3.33). Bu kuyucuklara her kuyucukta 10<sup>8</sup> kob/ml olacak şekilde *L. rhamnosus* 12 inokule edilmiştir. Bütün plaklar %5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda 37 C de 48 saat süre ile inkübe edilmiştir. Çalışma 3 paralel olarak kurulmuştur.



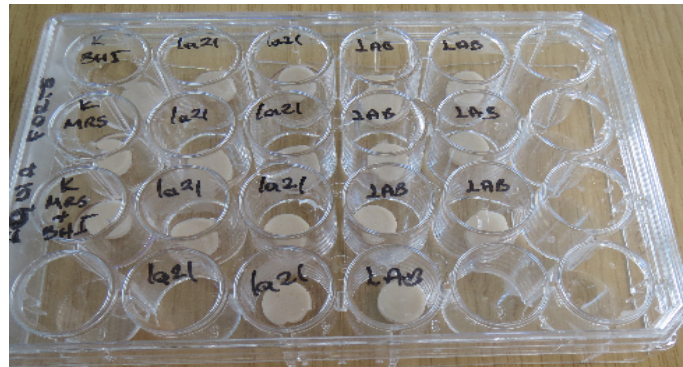
**Resim 3.27.** Hazırlanan disklerin steril tükürük içine yerleştirilmesi



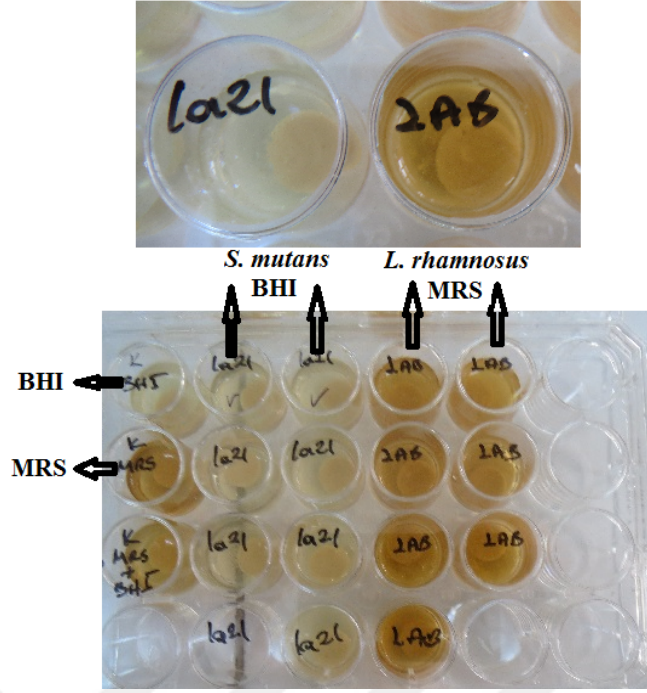
**Resim 3.28.** Restoratif materyallerden hazırlanan diskler tükürük içinden çıkarıldıktan sonra



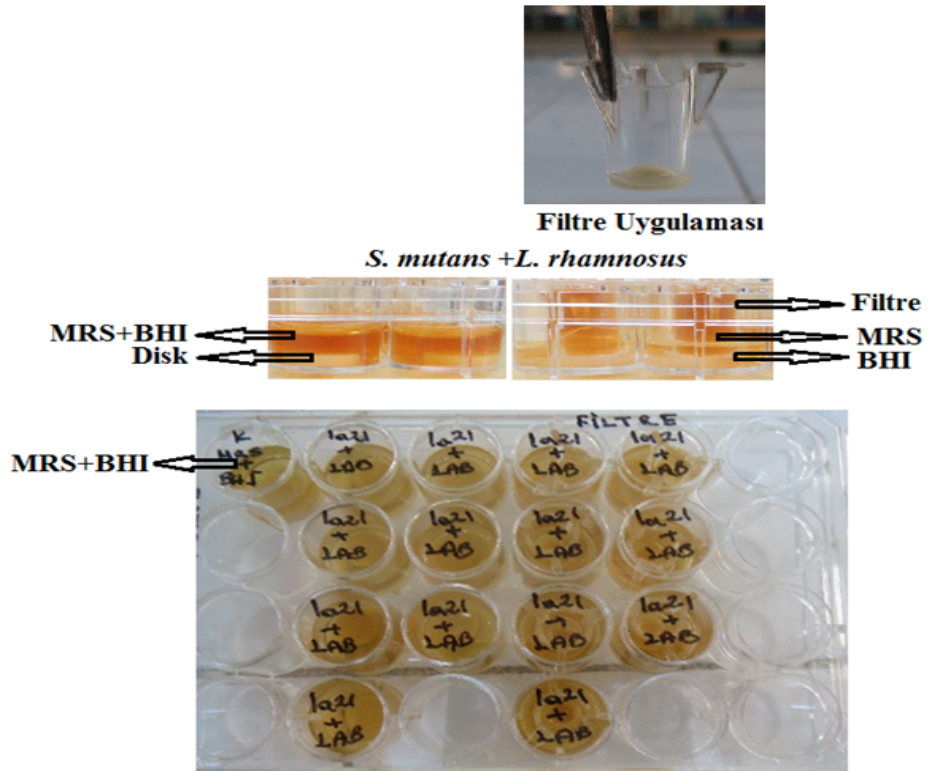
**Resim 3.29.** Disklerin yıkanması



**Resim3.30** .Disklerin çok kuyucuklu polistren plakalara yerleştirilmesi.

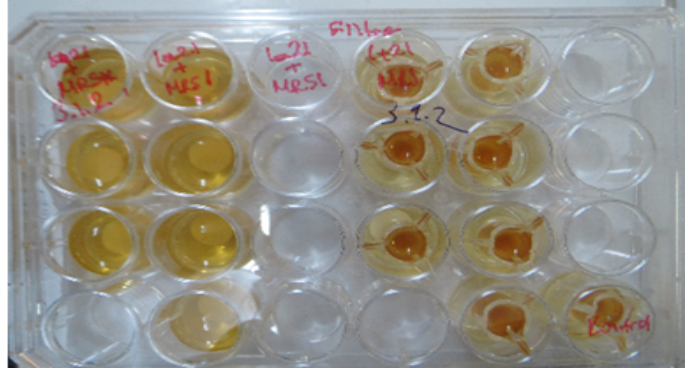


**Resim 3.31.** *S. mutans* 1 ve *L. rhamnosus* 12 içeren disklerin ve besiyerlerinin dağılışı



**Resim 3.32.** *S. mutans* 1 ve *L. rhamnosus* 12 birlikte içeren disklerin ve besiyerlerinin dağılışı

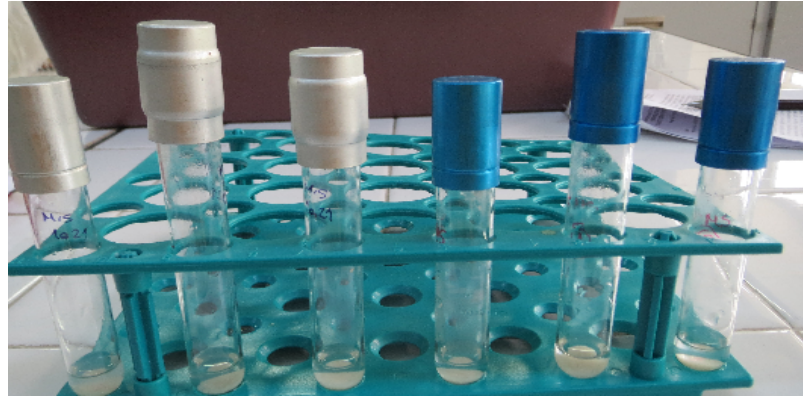




**Resim 3.33.** Filtre yerleştirilmiş ve filtre olmayan kuyucukların yukarıdan görünüşü

### 3.10.1 Restoratif Materyallerde Biyofilm Oluşturan Canlı Bakteri Sayısının Belirlenmesi

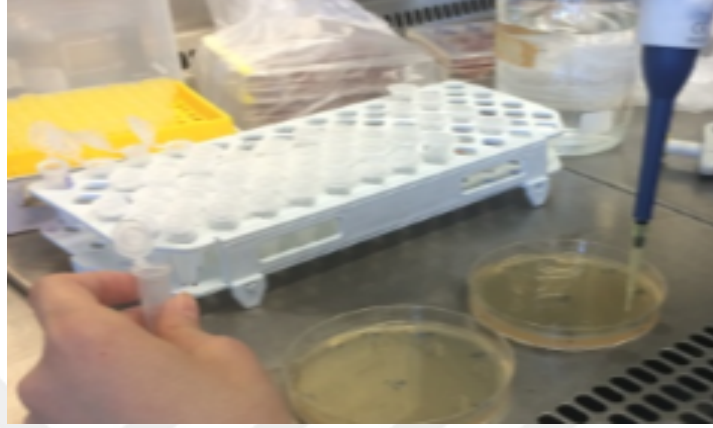
Biyofilm için hazırlanan ve 48 saat inkübe edilen kuyucuklardaki diskler fosfat tamponlu su (PBS) ile 3'er kez yıkanmış ve her disk içinde steril 1 ml fizyolojik tuzlu su (FTS) bulunan cam tüpe konulmuştur. (Resim 3.34)



**Resim 3.34.** Disk örneklerinin PBS ile 3 kez yıkandıktan sonra tüplere alınması.

Tüpler 4 dk ultrasonik banyoda tutulmuştur. FTS kullanılarak seri dilüsyonları hazırlanmıştır.

Her dilüsyondan *S. mutans* 1 için basitrasin mitis salivarius agara *L.rhamnosus* 12 için MRS agara damlatma plak yöntemi ile ekim yapılarak 37°Cde %10 CO<sub>2</sub> içeren ortamda 24-48 saat inkübe edilmiş ve oluşan koloniler sayılmıştır (Resim 3.35 ).



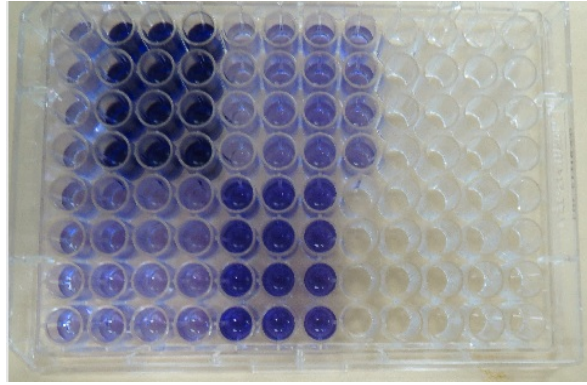
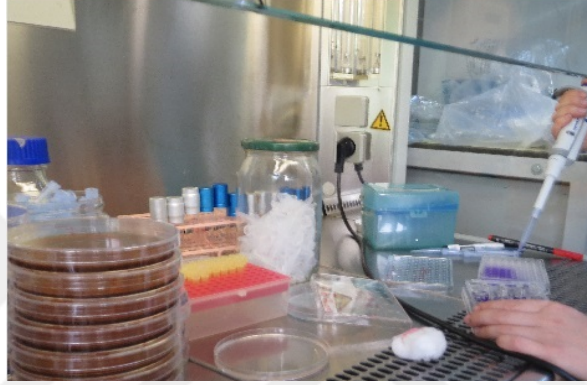
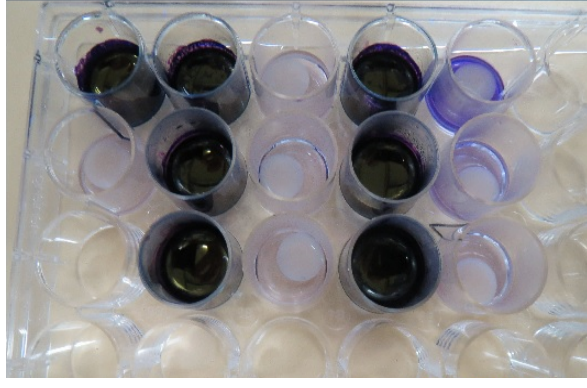
**Resim 3.35.** Ependorflarda seri dilüsyonun hazırlanması ve damla ekim işlemi.

### 3.10.2 Biyofilm Oluşumunun Spektrofotometre ile Değerlendirilmesi

Biyofilm için hazırlanan ve 48 saat inkübe edilen kuyucuklardaki diskler FTS'yle yıkanıp cam tüplere alınmış üzerlerine 1 ml %90 metanol konularak 15 dk bekletilmiştir. Metanol dökülüp kurutulduktan sonra 1 ml %2'lik kristal viyole eklenip ve 5 dk bekletilmiştir.

Petri içindeki disk yıkanarak başka bir kuyucuğa alınmış ve kuruması sağlanmıştır. Üzerlerine 1 ml %33'lük (v/v) glassiyel asetik asit konulmuştur ve karıştırılarak ve içlerinden 200 mikrolitre alınarak 96 kuyucuklu plakalara aktarılmıştır (Resim 3.36). 3 paralel çalışılıp ve örnekler spektrofotometre (Shimadzu, UV-2101PC) yardımı ile 570 nm dalga boyunda okuma yapılmıştır (184).

Ayrıca kuyucuklardaki son pH, pH metre ile ölçülmüştür.



**Resim 3.36.** Disklerden kristal viyole ile boyanan biyofilmin kaldırılması ve çok kuyucuklu plaklara yerleştirilmesi

### 3.10.3. SEM için Örneklerin Hazırlanması ve Görüntü Alınması

Örnekler 0.1 M cacodylate tampon ile yıkandıktan sonra %2.5'lik glutaraldehit ile oda sıcaklığında 1-1.5 saat fikse edilmiştir. Fiksasyon işleminden sonra örnekler cacodylate tampon ile tekrar yıkanmıştır. %1'lik OsO<sub>4</sub> ile 1 saat post-fiksasyon yapılmıştır. Cacodylate tampon ile 2-3 kez tekrar yıkanmıştır. Alkol serileri ile dehidrasyon işlemi yapılmıştır ve iki kez tekrarlanmıştır.

**Tablo 3.6.** Tez çalışmasında alkol serilerinin dehidratasyon işleminde kullanım oranları ve süreleri.

Alkol oranı	Uygulama süresi
%30	<b>15 dakika</b>
%50	<b>15 dakika</b>
%70	<b>15 dakika</b>
%90	<b>15 dakika</b>
%100	<b>15 dakika</b>

Alkol serilerinden sonra hemen Critical Point Dryer'da kurutma işlemi yapılmıştır. Daha sonra örnekler 40 mA'de 1 dakika altın ile kaplanmış ve SEM'de incelenmiştir (Tablo 3.6).

### 3.11. İstatistik Analizleri

Farklı restoratif materyallerde *S. mutans*'ın biyofilm oluşumu ve *L.rhamnosus*'un biyofilm oluşumu üzerine etkisi ANOVA varyans analiz tekniği ile yapılmıştır ( $P < 0,05$ ). Restoratif materyaller arasındaki farklılık ise Turkey testi ile belirlenmiştir.

## 4. BULGULAR

Dört oral laktik asit bakterisi 11 oral patojen bakteri çalışmaya alınmıştır. Stoktan çıkarılan bakterilerin öncelikle tanımlanması yapılarak saf kültür olduğu belirlenmiştir. Çünkü bakteriler çok kolaylıkla kontamine olabilirler. Kontamine kültürlerle çalışmakta çalışma sonuçlarının hatalı olmasına neden olmaktadır. Daha önce biyokimyasal olarak tanımlanan kültürlerin moleküler tanımlaması yapılarak tam olarak hangi bakteriler ile çalışıldığı ortaya konmuştur. Daha sonraki basamakta ise kültürlerin biyofilm oluşturma durumları belirlenmiştir. Çünkü bakterilerin biyofilm oluşturma özellikleri suşa göre büyük ölçüde değişmektedir. Patojen bakteriler içinde en yüksek biyofilm oluşturan bakterinin seçimi ile bu bakterinin biyofilm oluşturmaya üzerine etkin olan LAB diğer patojenler üzerine de etkin olabilecektir.

Gıdalar ile farklı şekerler alınmaktadır. Alınan bu şekerler farklı oranlarda biyofilm oluşumuna neden olmaktadır. Yüksek oranda biyofilm oluşturan şeker belirlenerek çalışmanın devam eden kısımlarında ortamda hangi şekerin kullanılacağı belirlenmeye çalışılmıştır.

Biyofilm oluşturan bakteriler genellikle çoklu antibiyotik dirençliliğine sahiptir. Bunu belirlemek için de antibiyotik duyarlılık çalışmaları yapılmıştır. Böylece çalışmalarda kullanılacak bakterilerin özellikleri belirlenmiştir.

Oral patojen bakteriler üzerine en etkili laktik asit bakteriyi belirlemek için ise LAB' nin antibakteriyal aktivitesi belirlenmiştir.

Böylece çalışmamızda kullanılacak patojen bakteri ve biyofilm oluşumunu engelleyen en etkili laktik asit bakterisi belirlenmiştir.

Bu çalışmalar sonucunda en yüksek biyofilm oluşturan patojen bakteri seçilerek, bu bakterinin en yüksek biyofilm oluşturduğu şeker belirlenmiştir. Seçilen oral patojen üzerine etkili olan LAB'de belirlenerek çalışmalara devam edilmiştir.

### 4.1. Test bakterilerinin tanımlanması

Test mikroorganizması olarak seçilen bakterilerin hepsinin Gram pozitif olduğu görülmüştür. Bu bakterilerden 11 izolatın kok, 4 izolatın ise basil şeklinde olduğu

belirlenmiştir. Katalaz testi sonucu kültürlerin hepsinin katalaz negatif özellik gösterdiği saptanmıştır ( Tablo 4.1).

**Tablo 4.1.** Test bakterilerinin bazı özellikleri

İzolat no	Bakteri	Gram	Hücre şekli	Katalaz	Oksidaz	Hemoliz
1	<i>S.mutans</i>	+	Kok	-	-	+
2	<i>S.mutans</i>	+	Kok	-	-	+
3	<i>S. constellatus</i>	+	Kok	-	-	+ beta hemoliz
4	<i>S.anginosus</i>	+	Kok	-	-	+ beta hemoliz
5	<i>S.anginosus</i>	+	Kok	-	-	+ beta hemoliz
6	<i>E.faecium</i>	+	Kok	-	-	-
7	<i>S. sanguinis</i>	+	Kok	-	-	+
8	<i>S. mutans</i>	+	Kok	-	-	+
9	<i>S. mutans</i>	+	Kok	-	-	+
10	<i>E. faecium</i>	+	Kok	-	-	-
11	<i>S.salivarius</i>	+	Kok	-	-	-
12	<i>L.rhamnosus</i>	+	Basil	-	-	-
13	<i>L. rhamnosus</i>	+	Basil	-	-	-
14	<i>L.rhamnosus</i>	+	Basil	-	-	-
15	<i>L.rhamnosus</i>	+	Basil	-	-	-

Api testlerine (Resim 4.1) göre test izolatlarından 4'ü *S.mutans*, 3'ü *S.anginosus*, 1'i *S.salivarius*, 1'i *S.sanguinis* ve 2'si *E.faecium* olarak belirlenmiştir. 4'ü ise *L. rhamnosus* olarak bulunmuştur (Resim 4.2 )



**Resim 4.1.** Api Strep 20 kiti ile biyokimyasal testlerin uygulanması



**Resim 4.2.** API CHL 50 paneli ile biyokimyasal testlerin uygulanması

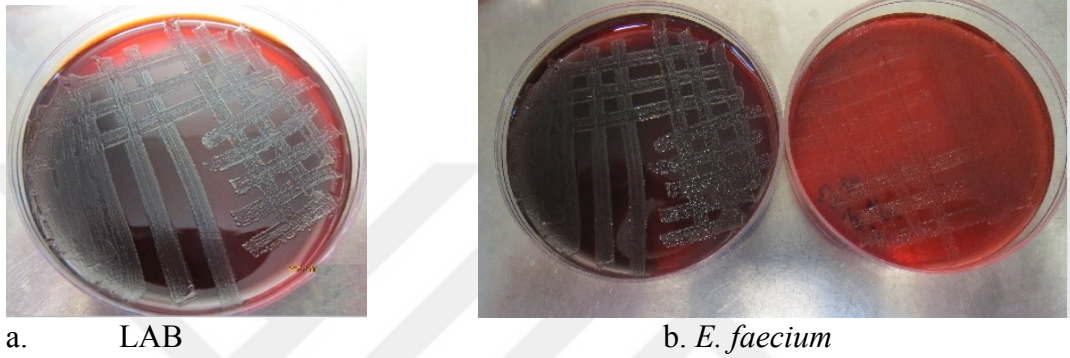
16S rRNA dizi analizine göre ise test izolatlarından 4'ü *S.mutans*, 2'si *S.anginosus*, 1'i *S.salivarius*, 1'i *S.sanguinis*, 1'i *S.constellatus*, ve 2'si *E.faecium* olarak belirlenmiştir. 4 ü ise *L.rhamnosus* olarak tanımlanmıştır (Tablo 4.2 ).

**Tablo 4.2.** Test bakterilerinin 16S rRNA dizi analizi ile genotipik karakterizasyon sonuçları

İzolat no	Tanımlama	Uzunluk (bp)	Benzerlik	Genbank Numarası
1	<i>S.mutans</i>	12706	99%	CP013237.1
2	<i>S.mutans</i>	2579	99%	KP975207.1
3	<i>S.constellatus</i>	2601	99%	AY277939.1
4	<i>S.anginosus</i>	10871	99%	CP012805.1
5	<i>S.anginosus</i>	2538	99%	AF145244.1
6	<i>E.faecium</i>	2597	99%	KR054671.1
7	<i>S.sanguinis</i>	2590	99%	LC145554.1
8	<i>S.mutans</i>	2590	99%	KP975201.1
9	<i>S.mutans</i>	2606	99%	KP975202.1
10	<i>E.faecium</i>	2542	99%	KU239982.1
11	<i>S.salivarius</i>	20732	99%	CP014144.1
12	<i>L.rhamnosus</i>	2601	99%	KM513646.1
13	<i>L.rhamnosus</i>	7779	86%	LT220504.1
14	<i>L.rhamnosus</i>	2582	99%	KM513646.1
15	<i>L.rhamnosus</i>	2573	99%	KM513646.1

## 4.2. İzolatların Biyofilm Oluşturma Özelliklerinin Belirlenmesi

İzolatların biyofilm oluşturup oluşturmadığı % 1 sükröz içeren Kongo kırmızısı agarda yapılmıştır. Koyu siyah renkli koloni oluşumu yüksek biyofilme işaret ederken açık renkli koloni zayıf biyofilm oluşumuna işaret etmektedir. *L.rhamnosus* izolatlarının hepsi koyu siyah renkli koloniler oluşturmuştur (Resim 4.3 ve 4.4 )



Resim 4.3. CRA plaklarında biyofilm oluşumu.



Resim 4.4. CRA plaklarında Streptokok suşlarında biyofilm oluşumu.

Biyofilm oluşturma durumları Tablo 4.3'de verilmiştir. *S. mutans* 9 CRA plaklarında biyofilm oluşturmazken diğer *S. mutans* suşları yüksek biyofilm oluşturmuştur. *S.anginosus* 4 ve *S.sanguinis* 7 zayıf biyofilm oluşturmuştur. *S.constellatus* 3 biyofilm oluşturmamıştır.

Mikrotitrasyon yöntemi ile laktik asit bakterilerinin biyofilm oluşumu Şekil 4.1'de verilmiştir. Mikrotitrasyon plağında yüksek biyofilm oluşturan suşlar koyu mavi bir renk



alırken zayıf biyofilm oluşturan izolatlarda açık renk görülmektedir (Resim 4.5). Şekil 4.1`de görüldüğü gibi farklı karbon kaynaklarında *L.rhamnosus* suşlarının oluşturduğu biyofilm miktarları suşlara göre değişmiştir. *L.rhamnosus* 12 sükröz hariç bütün şekerlerde yüksek biyofilm oluştururken *L.rhamnosus* 13 ise bütün şekerlerde en düşük biyofilm oluşturmuştur. Ancak *L.rhamnosus* 12 sükrözde diğer şekerlere göre daha az biyofilm oluştururken diğer suşlar sükrözde diğer şekerlere göre daha yüksek biyofilm oluşturmuştur.

**Tablo 4.3.** CRA plaklarında izolatların biyofilm oluşturma durumu

İzolat	CRA
<b>LAB</b>	
<i>L.rhamnosus</i> 12	+++
<i>L.rhamnosus</i> 13	++
<i>L.rhamnosus</i> 14	+++
<i>L.rhamnosus</i> 15	+++
<b>Streptokok suşları</b>	
<i>S. mutans</i> 1	+++
<i>S. mutans</i> 8	+++
<i>S. mutans</i> 9	-
<i>S. mutans</i> 2	++
<i>S. sanguinis</i> 7	+
<i>S. anginosus</i> 4	+
<i>S. anginosus</i> 5	+++
<i>S. salivarius</i> 11	+++
<i>S.constellatus</i> 3	-
<i>E.faecium</i> 6	+++
<i>E.faecium</i> 10	-

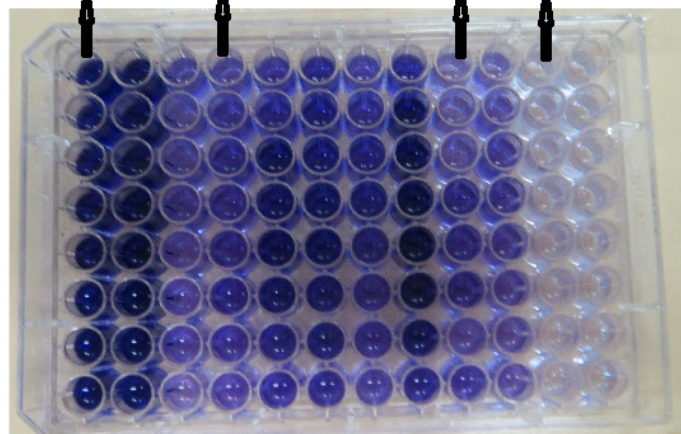
- Biyofilm yok (OD<120); + Zayıf biyofilm (OD =120-240)

++ Orta derecede biyofilm (OD= 241- 540);

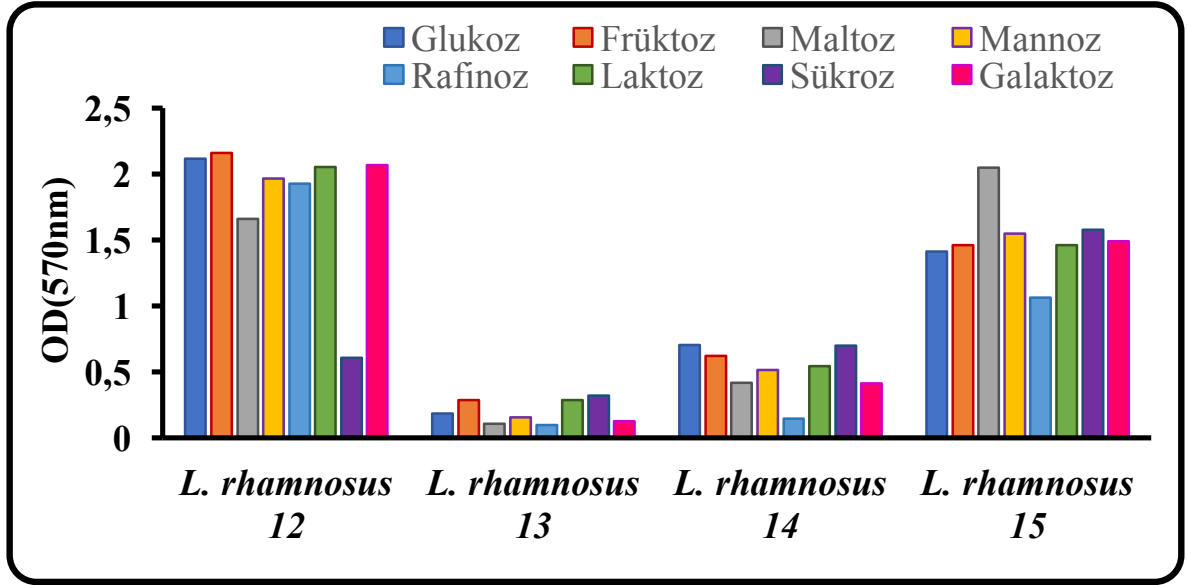
+++ Yüksek biyofilm (OD>540)

**Yüksek biyofilm**

**Düşük biyofilm**



**Resim 4.5.** Mikrotitrasyon plağı



Şekil 4.1. Laktik asit bakterilerinin farklı şeker içeren ortamlarda biyofilm oluşturma durumları

Streptokok suşları farklı şeker içeren ortamlarda değişen oranlarda biyofilm oluşturmuştur (Şekil 4.2). Dört *S.mutans* suşundan *S.mutans* 1, *S.mutans* 2 ve *S.mutans* 8 yüksek biyofilm oluştururken *S.mutans* 9 daha düşük oranda biyofilm oluşturmuştur. En yüksek biyofilm oluşumu sükrozda olmuştur. *S.anginosus* 5 hariç diğer streptokok suşlarında biyofilm oluşumu daha düşük olmuştur. *E.faecium* 10 düşük biyofilm oluştururken *E.faecium* 6 özellikle sükrozda çok yüksek biyofilm oluşturmuştur.

#### 4.3. Seçilen izolatlarının antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi

Test bakterilerinin antibiyotiklere hassasiyet durumları Tablo 4.4 ve 4.5'de verilmiştir. Streptokokların antibiyotiklere dirençlilikleri farklı olmuştur (resim 4.5). *S.mutans* 1 üç antibiyotiğe karşı direnç gösterirken *S.mutans* 9 bütün antibiyotiklere karşı hassas olarak bulunmuştur. Vankomisin ve klindamisin en etkili antibiyotik olarak saptanmıştır (Tablo 4.4 ).

**Tablo 4.4.** Streptokokların antibiyotik hassasiyeti

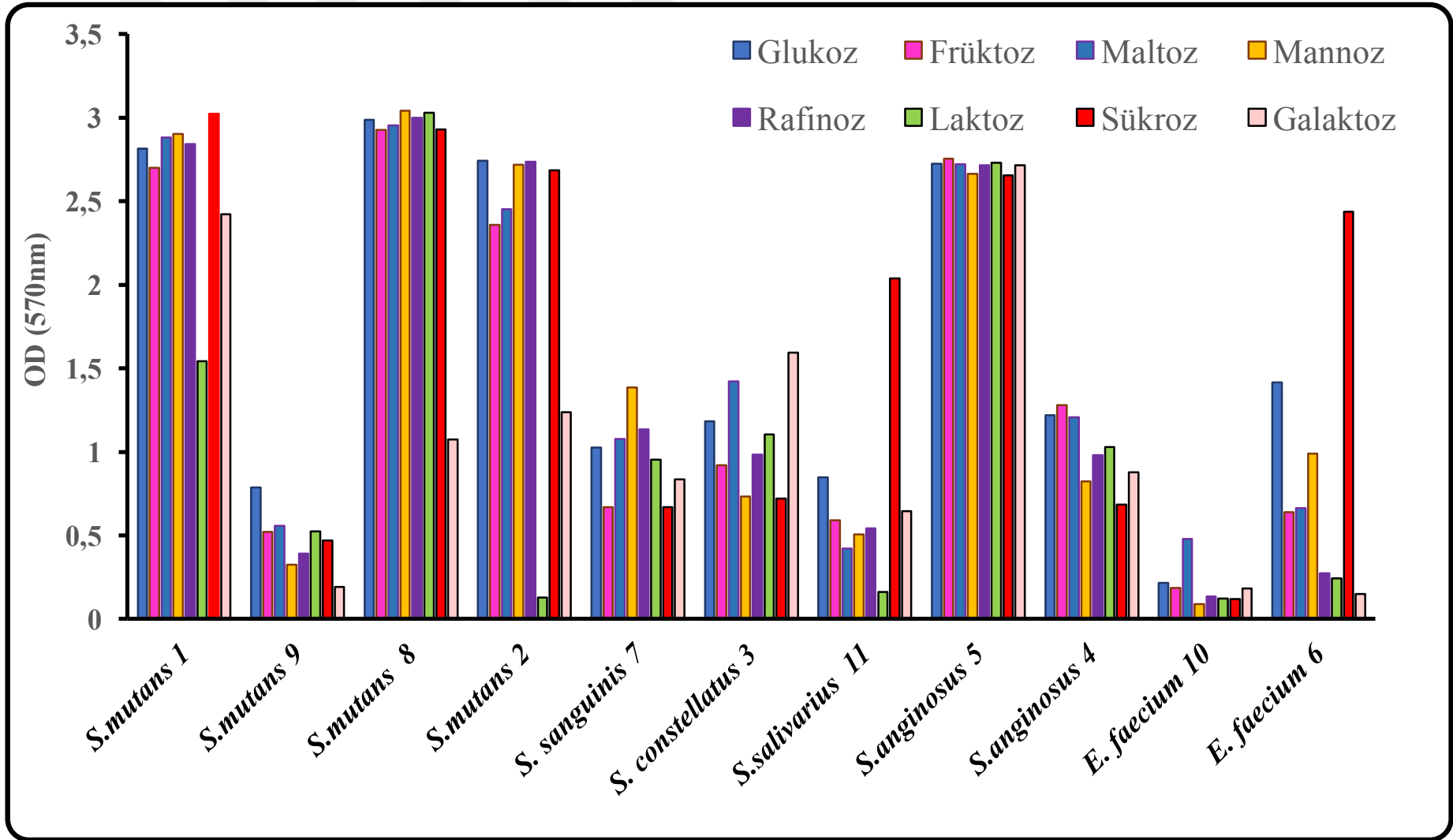
Antibiyotikler	<i>S. mutans</i> 1	<i>S. mutans</i> 9	<i>S. mutans</i> 2	<i>E. faecium</i> 6	<i>E. faecium</i> 10	<i>S. mutans</i> 8	<i>S. salivarius</i> 11	<i>S. anginosus</i> 5	<i>S. anginosus</i> 4	<i>S. constellatus</i> 3	<i>S. sanguinis</i> 7
Penicilin G(P 10U)	R	S	S	S	R	R	R	S	R	R	R
Kloramfenikol (C30 µg)	S	S	S	S	I	S	I	R	S	S	S
Ampisilin (AM 10 µg),	R	S	R	S	S	S	R	R	S	S	S
Klindamisin (DA 2 µg),	S	S	S	S	R	S	S	I	I	I	S
Linezolit (LNZ 30 µg )	R	S	S	S	R	S	R	S	R	R	R
Eritromisin (E 15 µg)	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S
Tetrasiklin (TE 30 µg)	S	S	R	I	R	S	R	S	R	R	R
Vankomisin (VA 30 µg)	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S

R (Dirençli) S (Duyarlı) I (İntermedial)

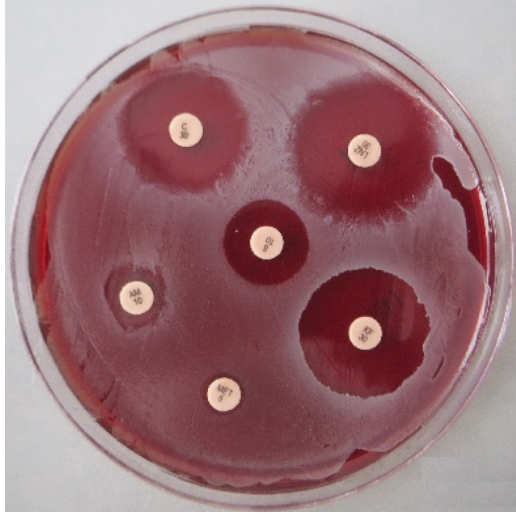
*L.rhamnosus* suşları antibiyotiklere daha dirençli olarak bulunmuştur. Bütün *L.rhamnosus* suşları vankomisin, gentamisin, amikazin, metradiazol antibiyotiklerine dirençli olarak bulunmuştur (Tablo 4.5).

**Tablo 4.5.** Laktik asit bakterilerinin antibiyotik hassasiyeti

Antibiyotikler	<i>L.rhamnosus</i> 12	<i>L.rhamnosus</i> 13	<i>L.rhamnosus</i> 14	<i>L.rhamnosus</i> 15
İmipenem (IPM 10 µg)	18	20	30	24
Penicilin G ( P 10U)	35	35	R	30
Kanamisin (K 30 µg)	R	R	35	R
Kloramfenikol (C30 µg)	24	35	35	28
Gentamisin (CN 10µg)	R	R	R	R
Metisilin (ME 5 µg)	22	20	18	12
Ampisilin (AM 10 µg)	12	24	28	26
klindamisin (DA 2 µg)	14	20	20	24
Okzasilin (OX 1 µg),	14	12	R	12
Linezolit (LNZ 30 µg )	20	30	35	26
Eritromisin (E 15 µg)	16	30	35	30
Streptomisin (S 10 µg)	10	18	12	10
Amikasin (AK 30 µg),	R	R	R	R
Tetrasiklin (TE 30 µg)	25	20	30	30
Metronidazol (MET 5µg)	R	R	R	R
Netilmisin (NET 30 µg)	R	12	R	R
Vankomisin (VA 30 µg)	R	R	R	R
Cefolatın (KF 30 µg ),	35	35	30	32



Şekil 4.2. Streptokok izolatlarının ve *E. faecium* suşlarının çeşitli karbon kaynaklarını içeren ortamlarda biyofilm oluşturma durumları



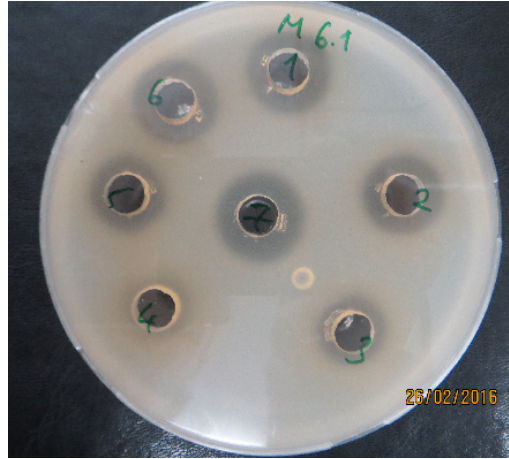
**Resim 4.6.** Streptokoklarda antibiyogram

#### **4.4. Antibakteriyel Aktivite Tayini**

*L.rhamnosus* suşlarının antimikrobiyal aktivitesi iki yöntemle belirlenmiştir. Damlatma yönteminde *L. rhamnosus* suşları MRS agar üzerine geliştirilerek üzerine test bakterilerini içeren yumuşak agar ilave edilerek bakterilerin gelişimi incelenmiştir. Test bakterileri üzerine *L.rhamnosus* suşlarının antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir (Resim 4.7 ).



**Resim 4.7.** Damlatma yöntemi ile *L rhamnosus* suşlarının antibakteriyel aktivitesinin belirlenmesi



**Resim 4.8.** Kuyucuk yöntemi ile antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi

Kuyucuk yöntemi ile *L.rhamnosus* suşlarının hüresiz filtratlarının antimikrobiyal aktivitesi belirlenmiştir (Resim 4.8 ). Tablo 4.6`da *L.rhamnosus* suşlarının hüresiz filtratlarının antibakteriyal aktivitesi oluşan zon çapı (mm) olarak verilmiştir. *L.rhamnosus* 12 ve *L.rhamnosus* 14'ün hüresiz filtratları test bakterilerinin hepsi üzerine etkili olmuştur. *L.rhamnosus* 13, *S.mutans* 8 hariç diğer bakteriler üzerine etkili olurken *L.rhamnosus* 15, *S.mutans* 8 ve *S.mutans* 9 dışındaki diğer bakteriler üzerine etkili olmuştur.

**Tablo 4.6.** *L.rhamnosus* suşlarının antibakteriyal aktivitesi ( zon çapı mm)

Bakteriler	<i>L.rhamnosus</i> 12	<i>L.rhamnosus</i> 15	<i>L.rhamnosus</i> 13	<i>L.rhamnosus</i> 14
<i>S. mutans</i> 1	16	14	14	15
<i>S. mutans</i> 2	17	16	16	18
<i>S.mutans</i> 9	15	-	10	17
<i>S.mutans</i> 8	15	-	-	15
<i>S.constellatus</i> 3	15	11	12	15
<i>S.anginosus</i> 4	13	11	12	13
<i>S.anginosus</i> 5	11	11	11	11
<i>S.sanguinis</i> 7	14	14	12	13
<i>S.salivarus</i> 11	14	12	12	14
<i>E.faecium</i> 6	15	14	14	15
<i>E.faecium</i> 10	15	12	12	15

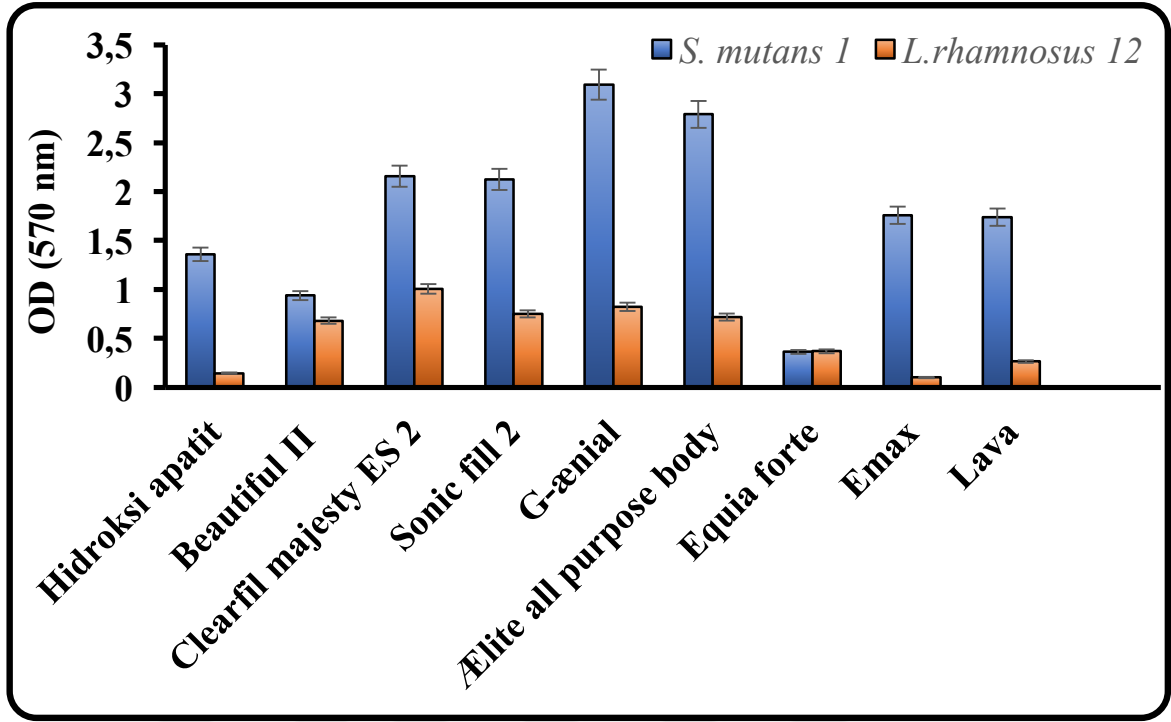
#### 4.5. Restoratif Materyallerde *S. mutans* 1'in Biyofilm Oluşturması ve *L.rhamnosus* 12'nin Biyofilm Oluşumu Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

Test bakterilerinin özelliklerine bakılarak *S.mutans* 1 ve *L.rhamnosus* 12 seçilerek çalışmalarda kullanılmıştır.

##### 4.5.1. Restoratif Materyallerde *S.mutans* 1 'in ve *L.rhamnosus* 12'nin Biyofilm Oluşturması

Restoratif dolgu materyalleri ve CAD/CAM blok materyallerde *S.mutans* 1 ve *L.rhamnosus* 12 değişen oranlarda biyofilm oluşturmuştur (Şekil 4.3). Spektrofotometrik değerlendirmede *S.mutans* 1 en yüksek biyofilmi G-ænial (GC)`de oluşturmuştur. Biyofilmdeki bakteri sayılarına bakıldığında (Resim 4.9 ve 4.10) ise en yüksek *S.mutans* 1 sayısı, Equia Forte (GC) ( $8,36 \pm 0,41 \log_{10}/\text{mL}$ ), Beautiful II (Shofu) ( $7,80 \pm 0,61 \log_{10}/\text{mL}$ ), G-ænial (GC) ( $7,88 \pm 0,69 \log_{10}/\text{mL}$ )` da olmuştur. Hidroksiapatitte ise  $6,66 \pm 0,68 \log_{10}/\text{mL}$  olarak bulunmuştur. En düşük bakteri sayısı ise Emax ( $5,5 \pm 0,70 \log_{10}/\text{mL}$ ) ve Lava`da ( $4,44 \pm 0,24 \log_{10}/\text{mL}$ ) elde edilmiştir ( Şekil 4.4). Bakteri canlılığı açısından yapılan annova testinde restoratif materyaller arasında *S.mutans* 1 sayısı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur ( $p < 0,001$ ).

Tukey testi ile materyaller birbirleri ile karşılaştırıldığında hidroksiapatit, Ælite all purpose body (Bisco), Sonic fill 2 (Kerr) ve Clearfil majesty ES 2 (Kuraray) arasında *S.mutans* 1 sayısı açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p > 0.05$ ). Ayrıca Ælite all purpose body (Bisco), Emax ile benzer sonuçlar gösterirken, Equia Forte, Beautiful II (shofu) ve G-ænial (Gc) *S.mutans* 1 sayısı açısından aynı grupta yer aldı. Lavada tüm restoratif materyallerden istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük sayım elde edilmiştir ( $p < 0,001$ ).



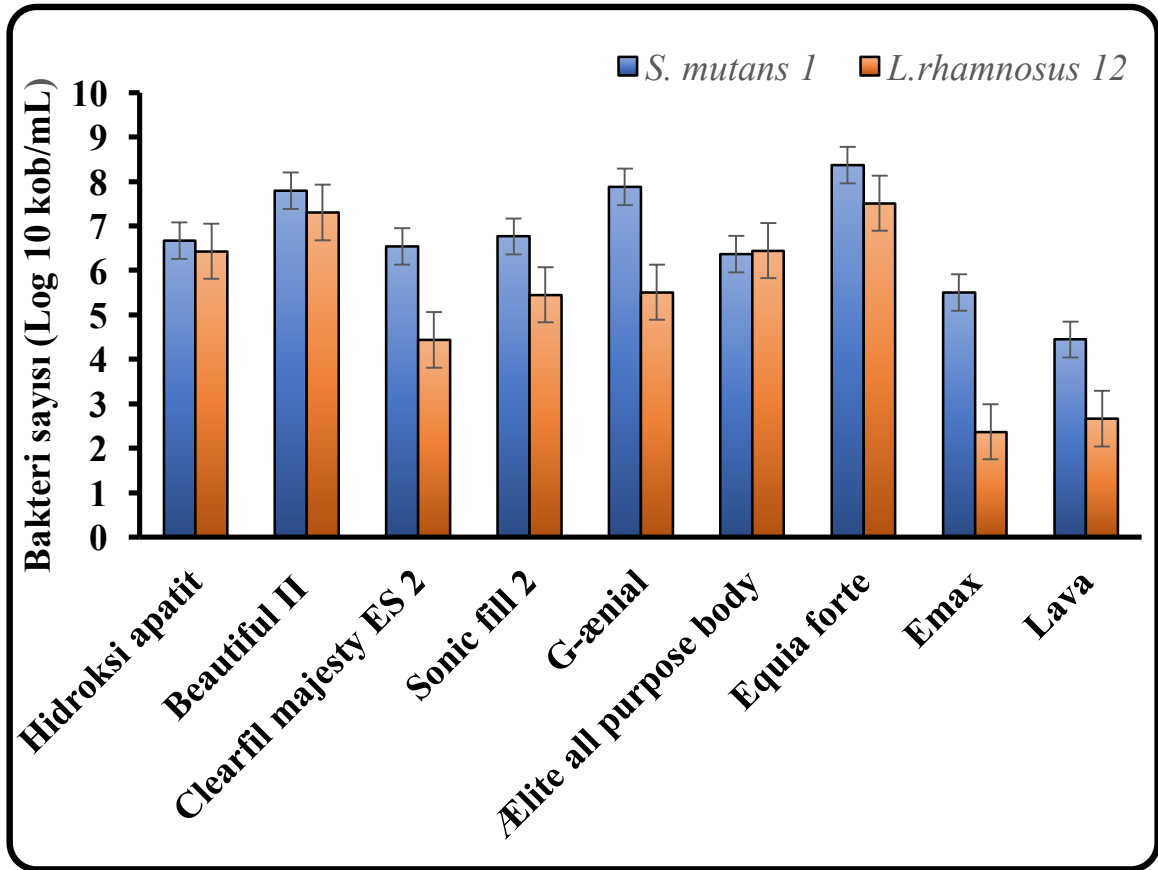
Şekil 4.3. Hidroksiapatit ve restoratif materyallerde *S.mutans* 1 ve *L.rhamnosus* 12'nin biyofilm oluşumu.

Hidroksiapatit ve restoratif materyallere ait disklerin Ra değerleri Tablo 4.7' de verilmiştir. Emax ve Lava en düşük Ra değerlerine sahipken Hidroksiapatit ve Equia Forte yüksek Ra değerlerine sahip olduğu belirlenmiştir.

**Tablo 4.7.** Restoratif materyallerin uygulamadan önce ölçülen Ra değerleri

Materyaller	Uygulamadan önce Ra
Hidroksi apatit	0,646±0,194
G-aenial	0,034±0,014
Kuraray	0,052±0,011
Bisco	0,038±0,015
Beautiful II	0,094±0,014
Sonic fill II	0,090±0,016
Equia Forte	0,418±0,188
Lava	0,024±0,013
Emax	0,015±0,006

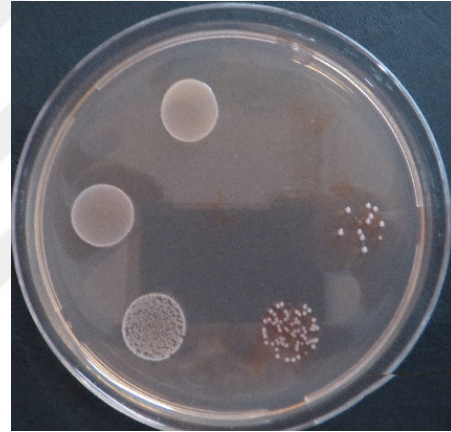
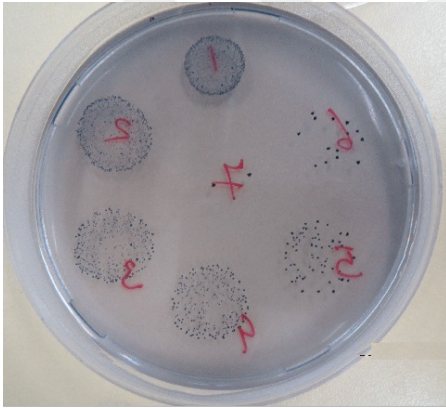




Şekil 4.4. Hidroksiapatit ve restoratif materyallerde *S.mutans 1* ve *L.rhamnosus 12* sayısı.

*L.rhamnosus 12*' nin biyofilm oluşumu ise restoratif materyallere göre değişmiştir. Sükroz içeren ortamda en yüksek biyofilm oluşumu Clearfil Majesty ES 2' de olmuştur. Bunu G-ænial, Sonic fill 2, Beautiful II ve Ælite All Purpose Body takip etmiştir. Hidroksiapatit, Emax ve Lava'da biyofilm oluşumu düşük olmuştur (Şekil 4.3). *L.rhamnosus 12* sayısı açısından incelendiğinde restoratif materyallere göre değişen oranlarda *L. rhamnosus 12* sayımları elde edilmiştir. En yüksek bakteri sayımları Equia Forte (7,51±0,19 log<sub>10</sub>/mL), ve Beautiful II (7,30±0,56 log<sub>10</sub>/mL)'de elde edilmiştir. Bunu Ælite all purpose body (6,44±0,30 log<sub>10</sub>/mL) ve hidroksiapatit (6,42±0,24 log<sub>10</sub>/mL) izlemiştir. Lava (2,66±0,56 log<sub>10</sub>/mL) ve Emax (2,36±0,50 log<sub>10</sub>/mL)'ta ise en düşük bakteri sayımları elde edilmiştir (Şekil 4.4). G-ænial (5,51±0,41 log<sub>10</sub>/mL), Sonic fill 2 (5,45±0,29 log<sub>10</sub>/mL) ve Clearfil Majesty ES 2 (4,44±0,38 log<sub>10</sub>/mL)'de ise değişen sayımlar elde edilmiştir. Yapılan annova testinde bütün restorasyon materyalleri arasında *L.rhamnosus 12* sayıları açısından istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık (p<0,001) olduğu görülmüştür.

Tukey testi ile materyaller birbirleri ile karşılaştırıldığında hidroksiapatit ile Ælite all purpose body aynı grupta yer alırken, Equia forte ve Beautiful II diğer tüm materyallerden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bakteri sayımı elde edilmiştir. G-aenial ile Sonic fill 2 birbirlerine benzer sonuçlar verirken her ikisininde diğer materyaller ile arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Clearfil Majesty ES 2 materyalinde yapılan sayım ise Emax ve Lava ile yapılan sayımdan istatistiksel olarak anlamlı derecede büyük ( $p<0.05$ ), diğer materyaller ile yapılan sayımlardan istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulundu ( $p<0,001$ ). *L. rhamnosus* 12 sayısı en düşük Emax`de tespit edildi. Lava ile arasındaki fark anlamlı değilken diğerlerinden istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı olarak düşük bulundu ( $p<0,001$ ). Lava ile elde edilen sonuçlarda Emax`a benzer bulundu.



**Resim 4.9.** *S.mutans* 1 sayım plağı basitrasin Mitis salivarius agarda. **Resim 4.10.** *L.rhamnosus* 12'nin sayım plağı MRS agar üzerinde

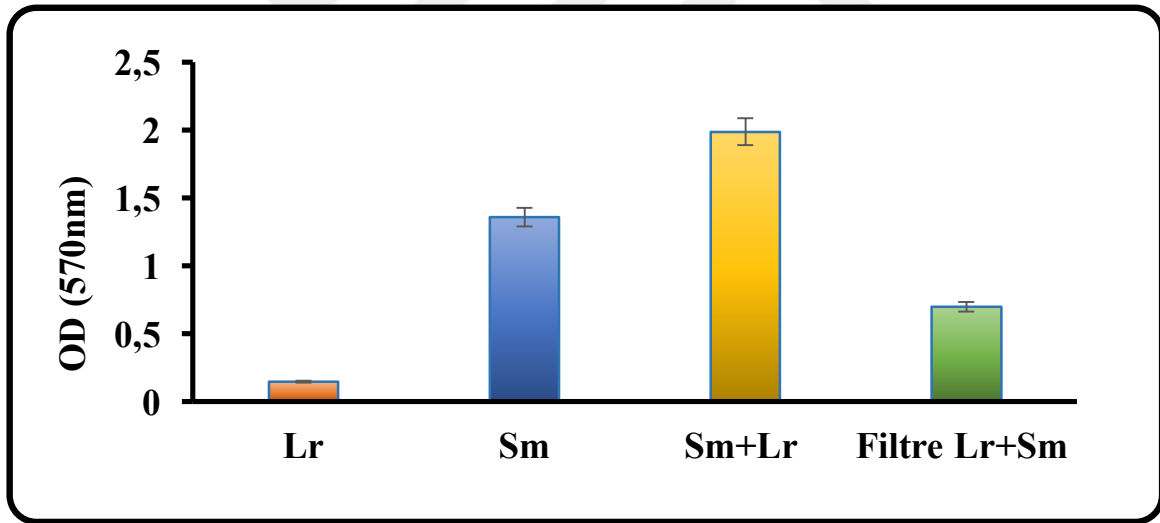
#### 4.5.2. Restoratif Materyallerde *S. mutans* 1'in Biyofilm Oluşturması Üzerine *L.rhamnosus* 12'nin Etkisinin Belirlenmesi

Hidroksiapatit üzerinde *S.mutans* 1 biyofilm oluştururken *L.rhamnosus* 12'nin biyofilm oluşturması çok düşük olmuştur. *S.mutans* 1 ve *L.rhamnosus* 12 birlikte uygulandığında biyofilm oluşumu daha fazla olmuştur. *L.rhamnosus* 12 filtre içine uygulanması durumunda ise biyofilm miktarı azalmıştır. *L.rhamnosus* 12' nin hücresiz filtratı *S.mutans* 1' in biyofilm oluşumu üzerine etkili olmuştur (Şekil 4.5).

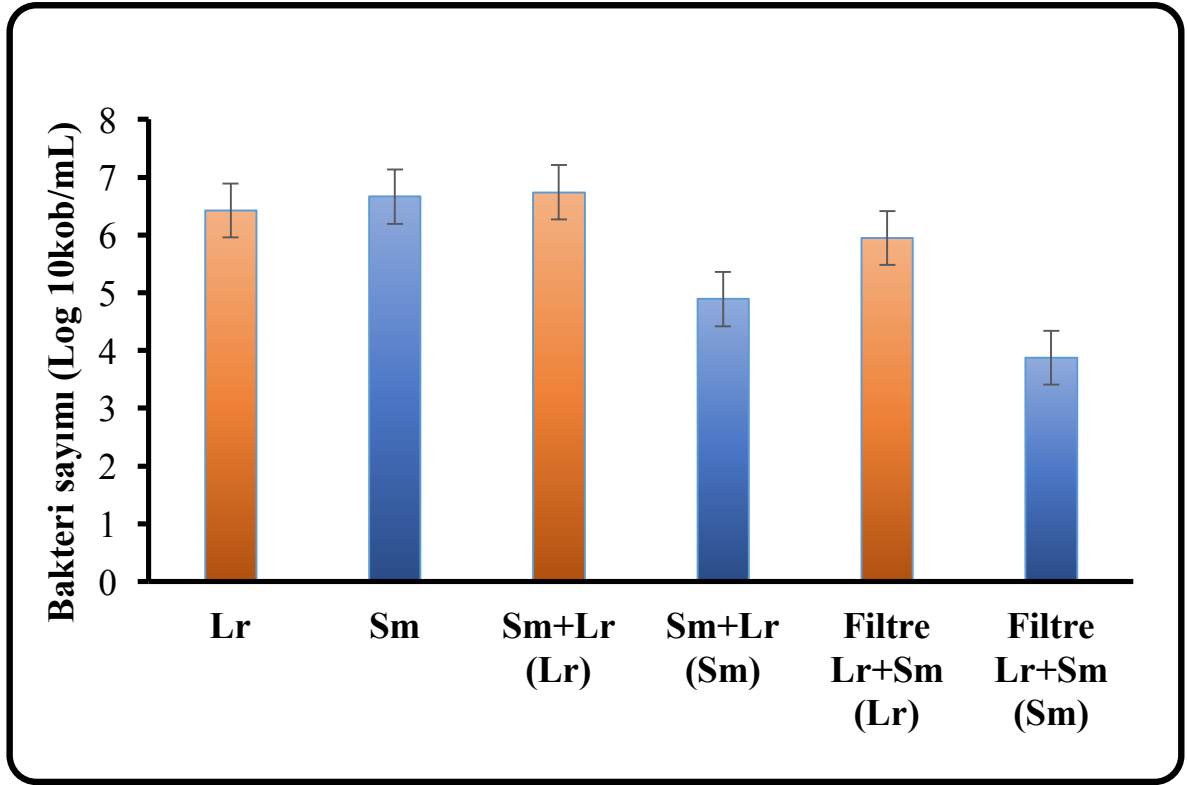
Biyofilmdeki bakteri sayımları şekil 4.6` da verilmiştir. Gerek *S.mutans* 1 sayısı ve gerekse *L.rhamnosus* 12 sayısı tek başlarına sırasıyla  $6,66 \pm 0,68 \log_{10}/\text{mL}$  ve  $6,43 \pm 0,24 \log_{10}/\text{mL}$  iken *S.mutans* 1 ve *L.rhamnosus* 12 birlikte uygulandığında *L.rhamnosus* 12 ( $6,74 \pm 0,59 \log_{10}/\text{mL}$ ) sayısı yükselmiştir. *S.mutans* 1 sayısı ise  $4,89 \pm 0,98 \log_{10}/\text{mL}$ 'e düşmüştür. Filtreli uygulamada ise *L.rhamnosus* 12, *S.mutans* 1 ( $3,87 \pm 0,52 \log_{10}/\text{mL}$ ) sayısında önemli ölçüde azalmaya neden olmuştur (Şekil 4.6).

Biyofilmdeki bakteri sayıları açısından bakıldığında bakteri sayıları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark belirlenmiştir ( $p < 0.05$ ). *S.mutans* 1 sayısı ile *L.rhamnosus* 12 ve *S.mutans* 1' in birlikte uygulandığı işlemlerdeki bakteri sayımları arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p < 0.05$ ).

*L.rhamnosus* 12' nin filtre içine uygulandığında *S.mutans* 1'in sayısı ile tek olarak uygulanan *S.mutans* 1 sayısı arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p < 0.05$ ).



Şekil 4.5. Hidroksiapatit disklerde *S.mutans* 1 in biyofilm oluşurması üzerine *L.rhamnosus* 12` nin etkisi.



**Şekil 4.6.** Hidroksiapatit diskler üzerinde biyofilm oluşturan canlı bakteri sayıları ( $\log_{10}$  kob /mL).

Hidroksiapatitin uygulamaya başlamadan önceki Ra değeri  $0,646 \pm 0,194$  iken uygulamadan sonra Ra değerleri artmıştır (Tablo 4.8). *S.mutans* 1 ile *L.rhamnosus* 12' nin bir arada uygulandığı işlemlerden sonraki Ra değeri bakterilerin tek başlarına uygulanmasından sonra elde edilen Ra değerlerinden daha düşük olmuştur.

Uygulamaların son pH değerleri Tablo 4.9' de verilmiştir. Tablodan da görüleceği üzere pH 4,18 ile 4,35 arasında değişmiştir.

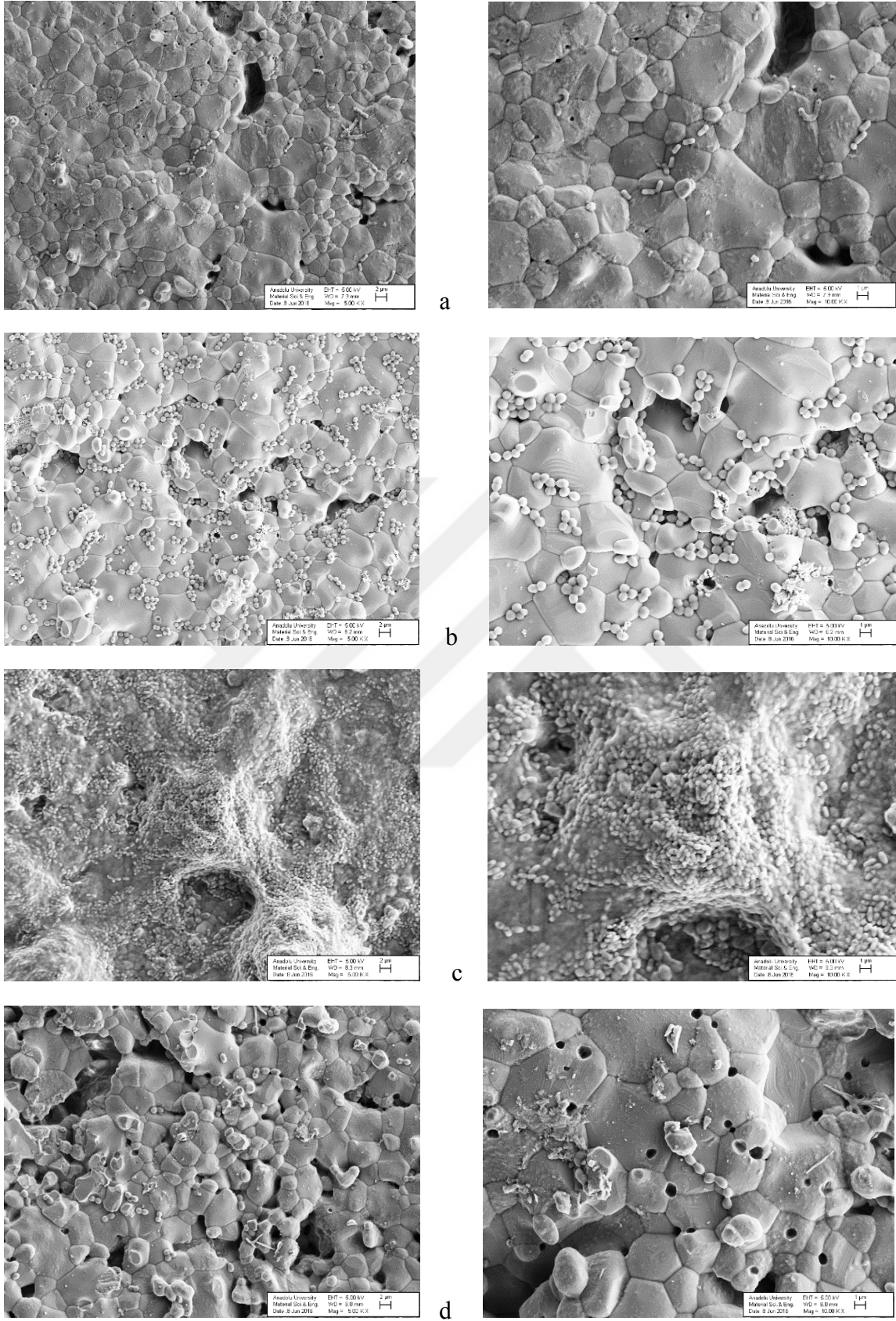
Elektron mikroskop görüntüleri Resim 4.11'de verilmiştir. Bu SEM görüntülerine bakıldığında *L.rhamnosus* 12 ve *S.mutans* 1 birlikte uygulandığında yüksek bir biyofilm oluşumu izlenmektedir. Bu durum *L.rhamnosus* 12' nin biyofilm oluşumu üzerine etkili olmadığı görülmektedir. Hatta yüksek oranda biyofilm oluşumuna neden olmuştur. Ancak filtre içine *L.rhamnosus* 12 uygulandığında daha etkili olduğu görülmüştür.

**Tablo 4.8.** Hidroksiapatitin uygulamadan önce ve uygulamadan sonraki pürüzlülük değerleri (Ra)

Uygulamadan önce		Uygulamadan sonra			
		Sm	Lr	Sm+Lr	Filtre Sm+Lr
Hidroksi apatit	0,646±0,194	0,843±0,073	0,893±0,137	0,771±0,131	0,722±0,035

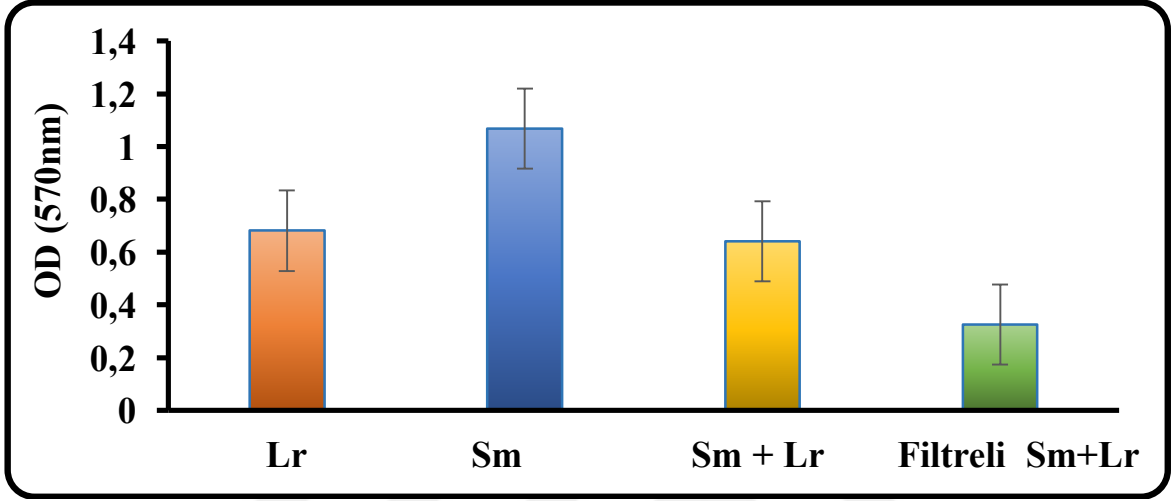
**Tablo 4.9.** Hidroksiapatitte uygulamalardan sonra elde edilen son pH değerleri

Uygulamalar	Lr	Sm	Lr + Sm (Lr)	Lr + Sm (Sm)	Filtre Lr + Sm (Lr)	Filtre Lr + Sm (Sm)
pH	4,18	4,66	4,20	4,20	4,35	4,35

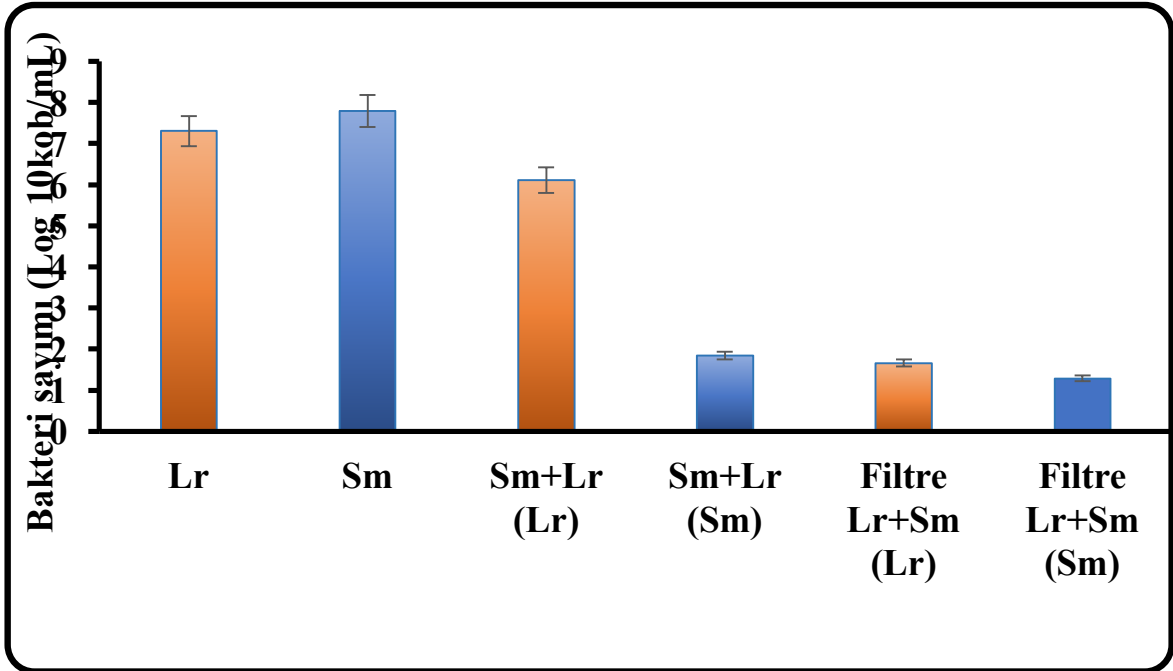


**Resim 4.11.** Hidroksiapatit diskler üzerinde biyofilm oluşumuna *L.rhamnosus* 12' nin etkisinin SEM görüntüleri (sol-X5000 ve sağ X10000).**a.** *L.rhamnosus* 12; **b.** *S.mutans* 1 **c.** *S.mutans* 1 ve *L.rhamnosus* 12 birlikte uygulandığında ; **d.** *S.mutans* 1 ve filtre içine *L.rhamnosus* 12 uygulandığında.

Beautiful II ile hazırlanan diskler üzerinde *S.mutans* 1 ve *L.rhamnosus* 12' nin biyofilm oluştururken *S.mutans* 1 ve *L.rhamnosus* 12 birlikte uygulandığında biyofilm oluşumunun azaldığı görülmüştür. *L.rhamnosus* 12 filtre içinde uygulanması durumunda ise *S.mutans* 1 tarafından oluşturulan biyofilm miktarı azalmıştır. *L.rhamnosus* 12'un hücresiz filtratı *S. mutans* 1' in biyofilm oluşumu üzerine etkili olmuştur (Şeki 4.7).



Şekil 4.7. Beautiful II disklerde *S. mutans* 1' in biyofilm oluşturması üzerine *L.rhamnosus* 12' nin etkisi.



Şekil 4.8. Beautiful II diskler üzerinde biyofilm oluşturan canlı bakteri sayıları (log<sub>10</sub> kob /mL).

Biyofilmdeki bakteri sayımları şekil 4.8`de verilmiştir. Gerek *S.mutans* 1 sayısı ve gerekse *L.rhamnosus* 12 sayısı tek başlarına sırasıyla  $7,80 \pm 0,61 \log_{10}/\text{mL}$  ve  $7,30 \pm 0,57 \log_{10}/\text{mL}$  iken *S.mutans* 1 ve *L.rhamnosus* 12 birlikte uygulandığında *S.mutans* 1 ( $1,85 \pm 0,93 \log_{10}/\text{mL}$ ) sayısı düşmüştür. Filtreli uygulamada ise *L.rhamnosus* 12, *S.mutans* 1 ( $1,29 \pm 0,17 \log_{10}/\text{mL}$ ) sayısında azalmaya neden olmuştur (Şeki 4.8).

Beautiful II ile hazırlanan diskler üzerinde *S.mutans* 1 biyofilm oluşturmaya üzerine *L.rhamnosus* 12 `nin etkili olduğu belirlenmiştir. İstatistiksel olarak tek olarak uygulanan *S.mutans* 1 sayısına göre *L.rhamnosus* 12 ile birlikte uygulandığında ve *L.rhamnosus* 12 filtre içinde uygulandığında *S.mutans* 1 sayısı anlamlı derecede farklı bulunmuştur ( $p < 0.001$  sırası ile  $p = 0,028$  ve  $0,028$ ). Birlikte uygulama ile filtre içinde uygulamanın *S.mutans* 1 sayısı üzerine etkileri arasında istatistiksel bir fark bulunamamıştır ( $p > 0.05$ ).

Bu veriler SEM görüntülerinde de doğrulanmıştır (Resim 4.12). Resimde *S.mutans* 1`in Beautiful II ile hazırlanan diskler üzerinde adezyonu görülmektedir. *S.mutans* 1 kalın bir tabaka halinde diskin üzerini kaplamıştır (Resim 4.12 b). *L.rhamnosus* 12 ile *S.mutans* 1 birlikte uygulandığında oluşan biyofilmin önemli ölçüde dağıldığı görülmektedir. Burada *L.rhamnosus* 12` de fazla sayıda olduğu için daha yoğun gibi görünse de *S.mutan* 1 `in daha az olduğu görülmektedir. *L.rhamnosus* 12` nin filtre içine uygulanmasında ise biyofilm oluşumu görülüyor.

Beautiful II` nin uygulamaya başlamadan önceki Ra değeri  $0,094 \pm 0,014$  iken uygulamadan sonra Ra değerleri artmıştır (Tablo 4.10).

Beautiful II materyalinde uygulamalarda ölçülen son pH değeri 3,95 ile 4,60 arasında değişmiştir (Tablo 4.11).

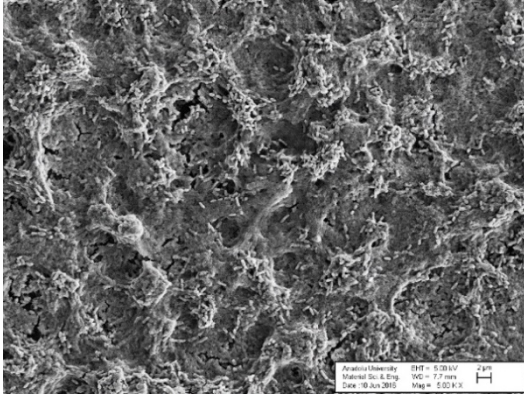


**Tablo 4.10.** Beautiful II' nin uygulamadan önce ve uygulamadan sonraki pürüzlülük değerleri (Ra)

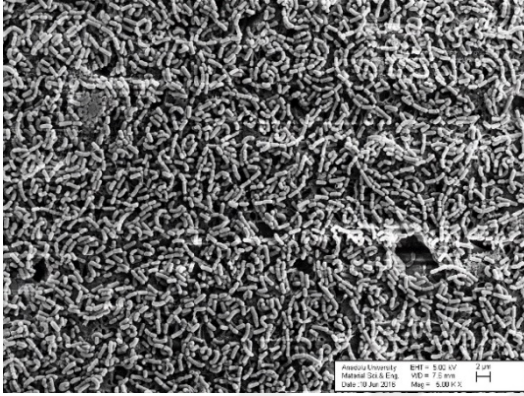
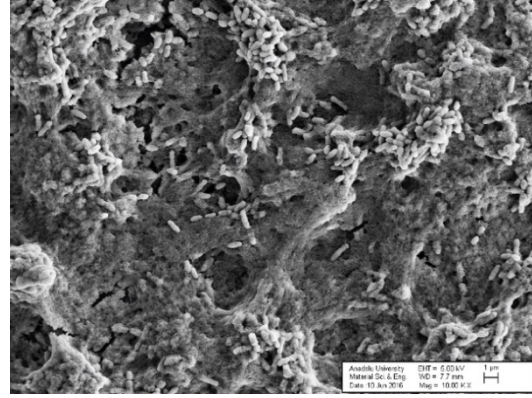
Uygulamadan önce		Uygulamadan sonra			
		Sm	Lr	Sm+Lr	Filtre Sm+Lr
Beautiful II (shofu)	0,094±0,014	0,141±0,005	0,112±0,003	0,212±0,021	0,110±0,008

**Tablo 4.11.** Beautiful II materyalinde uygulamalardan sonra elde edilen son pH değerleri

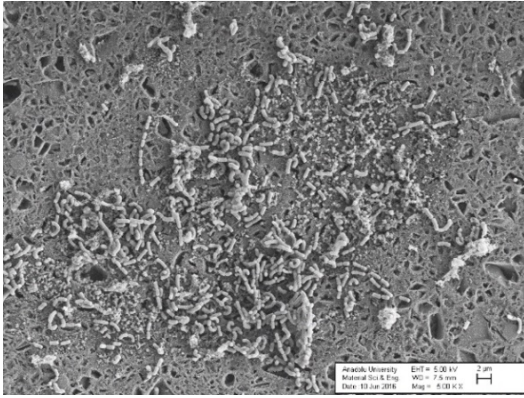
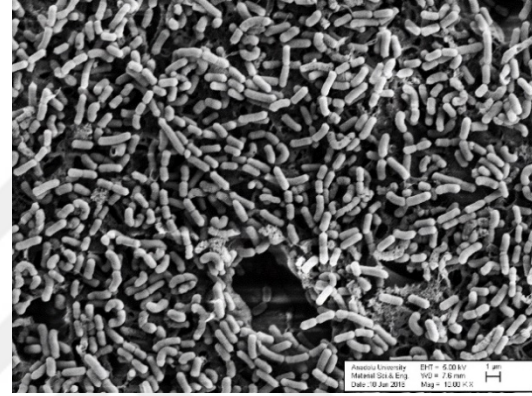
Uygulamalar	Lr	Sm	Lr + Sm (Lr)	Lr + Sm (Sm)	Filtre Lr + Sm (Lr)	Filtre Lr + Sm (Sm)
pH	4,60	4,08	3,95	3,94	4,33	4,00



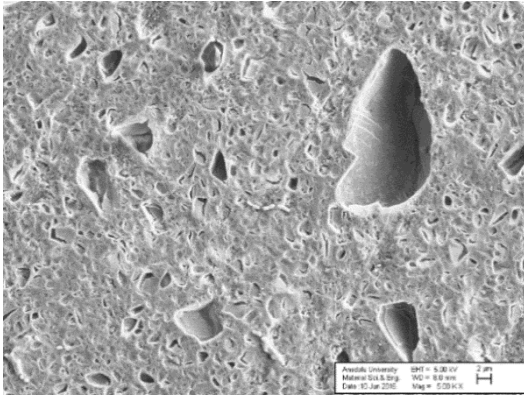
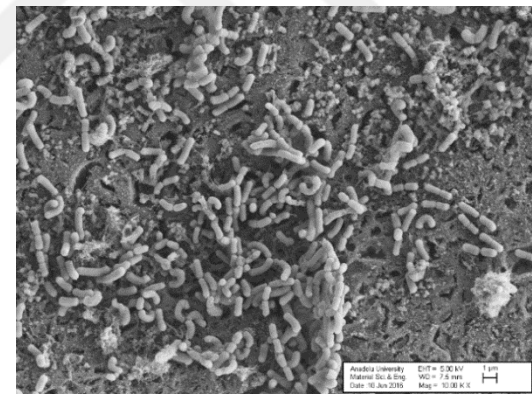
a



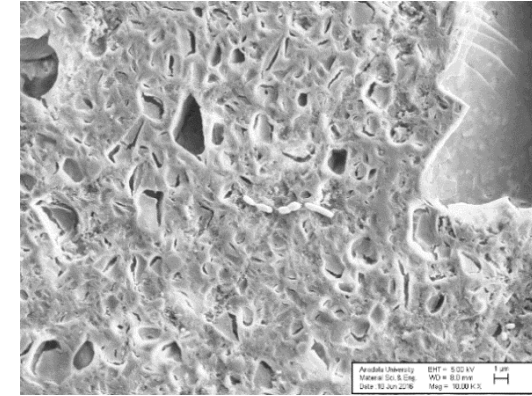
b



c

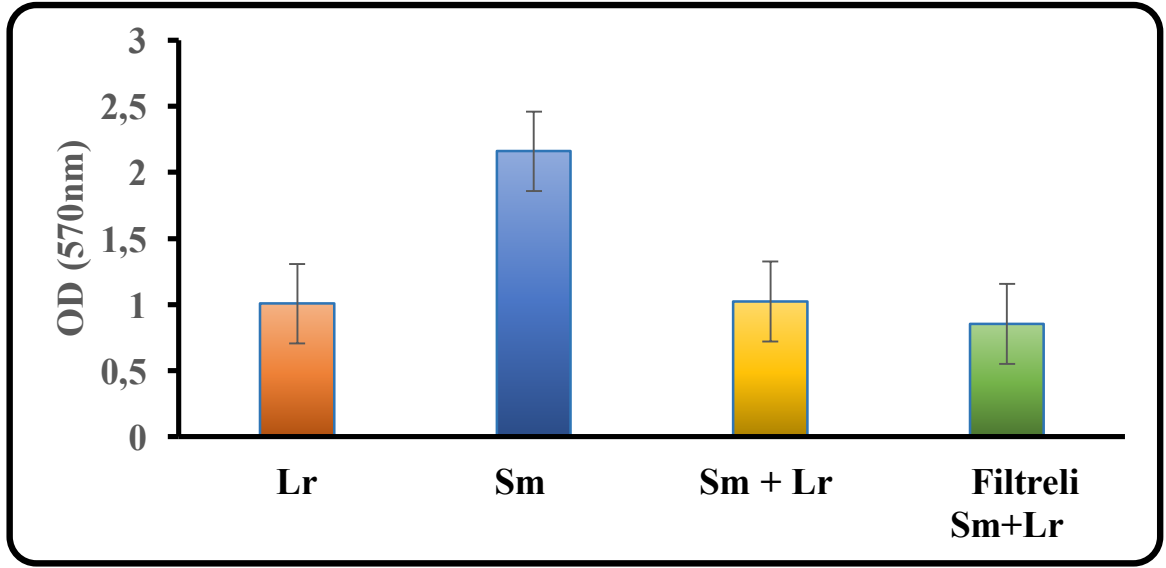


d



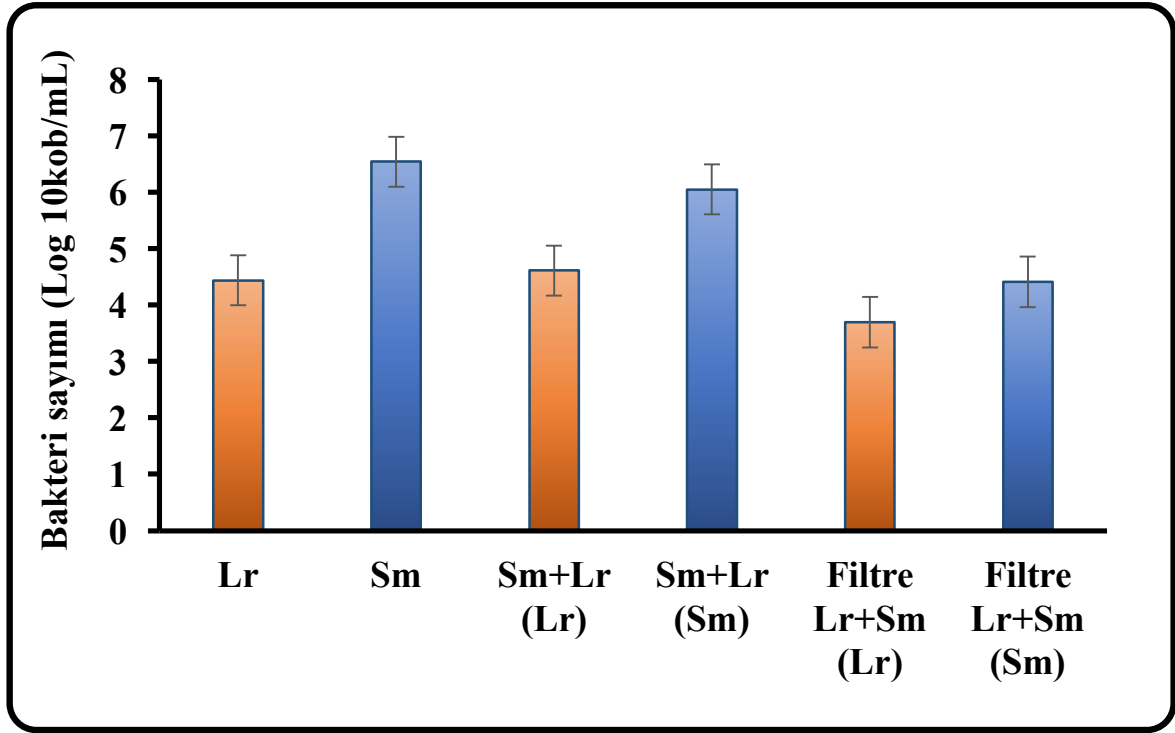
**Resim 4.12.** Beautiful II diskler üzerinde biyofilm oluşumuna *L.rhamnosus* 12' nin etkisinin SEM görüntüleri (X5000 ve X10000).; **a.** *L. rhamnosus* 12; **b.** *S.mutans* 1 **c.** *S.mutans* ve *L.rhamnosus* 12 birlikte uygulandığında ; **d.** *S.mutans* 1 ve filtre içine *L.rhamnosus* 12 uygulandığında.

Clearfil Majesty ES 2 ile hazırlanan diskler üzerinde *S.mutans* 1 yüksek biyofilm oluştururken, *L.rhamnosus* 12 daha düşük oranda biyofilm oluşturmuştur. *S.mutans* 1' in ve *L.rhamnosus* 12' nin birlikte uygulandığı uygulama ile *L.rhamnosus* 12' nin filtre içine uygulandığı uygulama arasında biyofilm oluşumu açısından bir fark gözlenmemiştir ( Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Clearfil Majesty ES 2 disklerde *S.mutans* 1 in biyofilm oluşturması üzerine *L.rhamnosus* 12' nin etkisi.

Clearfil Majesty ES 2'de bakteri sayılarına bakıldığında *S.mutans* 1 sayıları bütün uygulamalarda yüksek olarak bulunmuştur. Ancak *L.rhamnosus* 12' nin filtre içine uygulandığı işlemde *S.mutans* 1 ( $4,41 \pm 0,34 \log_{10}/\text{mL}$ ) sayısı daha düşük bulundu. Benzer olarak tek olarak uygulanan *S.mutans* 1 ile *L. rhamnosus* 12 ile birlikte uygulanan *S.mutans* 1 sayıları arasında istatistiksel açıdan önemli bir farklılık bulunmamıştır (sırasıyla  $6,54 \pm 0,29 \log_{10}/\text{mL}$  ve  $6,05 \pm 0,48 \log_{10}/\text{mL}$  ). *L.rhamnosus* 12' nin filtre içine uygulandığı işlemde *S.mutans* 1 sayısı ile diğer uygulamalar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur ( $p < 0.05$   $p = 0,028$ ). Clearfil Majesty ES 2'de *S.mutans* 1 üzerine *L.rhamnosus* 12 ' nin süpernatantı etkili olmuştur (Şekil 4.10).



**Şekil 4.10.** Clearfil Majesty ES 2 diskler üzerinde biyofilm oluşturan canlı bakteri sayıları ( $\log_{10}$  kob /mL).

SEM görüntüleri incelendiğinde de bu sonuçlarla uyumlu olduğu görülmektedir. *S.mutans* 1' in ve *S.mutans* 1 ile *L.rhamnosus* 12'nin birlikte uygulandığında biyofilm oluşumu görülmektedir. (Resim 4.13). Üç boyutlu biyofilm oluşumu resim 4.13'de b ve c'de görülmektedir. *L.rhamnosus* 12' nin filtre içine uygulandığı durumda ise biyofilm oluşumu görülmemektedir.

Clearfil Majesty ES 2'nin uygulamadan önceki Ra değeri düşük olarak belirlenmiştir (Tablo 4.12). Ancak uygulamalardan sonra ölçülen Ra değerleri yüksek çıkmıştır.

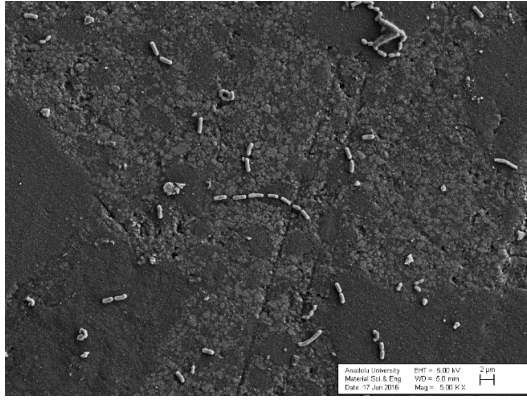
Clearfil Majesty ES 2 materyalinde uygulamalarda elde edilen son pH Tablo 4.13 'de verilmiştir. *L.rhamnosus* 12 ve *S.mutans* 1 tek başına uygulandığı işlemlerde sırasıyla pH 3,90 ve 3,95 olarak ölçülmüştür. Birlikte uygulama işleminde son pH 4,00, filtre içine uygulamada ise 4,18 olarak ölçülmüştür.

**Tablo 4.12.** Clearfil Majesty ES 2'nin uygulamadan önce ve uygulamadan sonraki pürüzlülük değerleri (Ra)

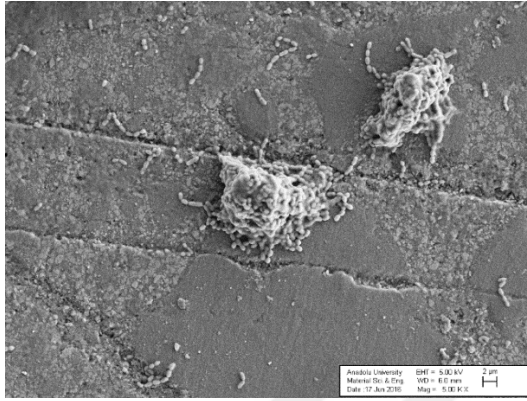
Uygulamadan önce		Uygulamadan sonra			
		Sm	Lr	Sm+Lr	Filtre Sm+Lr
Clearfil Majesty ES 2 (Kuraray)	0,052±0,011	0,088±0,003	0,100±0,007	0,087±0,012	0,077±0,005

**Tablo 4.13.** Clearfil Majesty ES 2 materyalinde uygulamalardan sonra elde edilen son pH değerleri

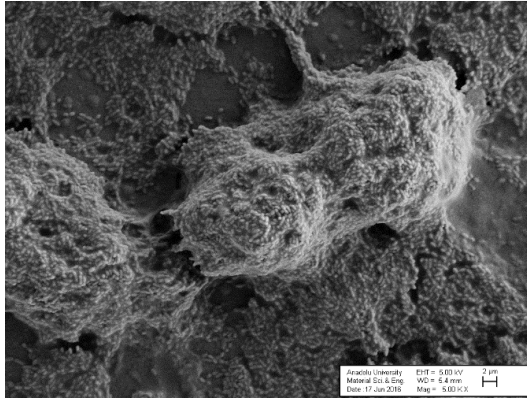
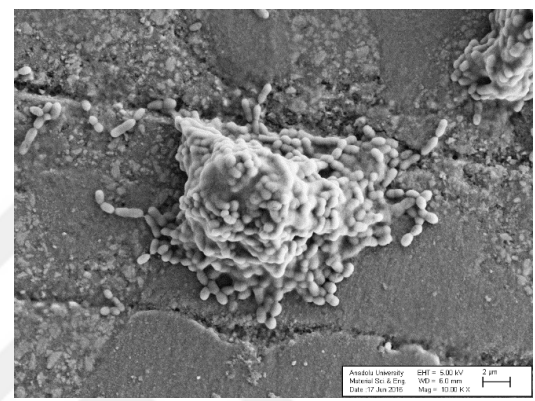
Uygulamalar	Lr	Sm	Lr + Sm (Lr)	Lr + Sm (Sm)	Filtre Lr + Sm (Lr)	Filtre Lr + Sm (Sm)
pH	3,90	3,95	4,00	4,00	4,18	4,18



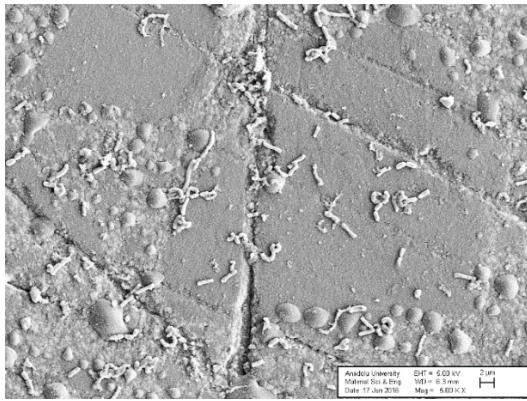
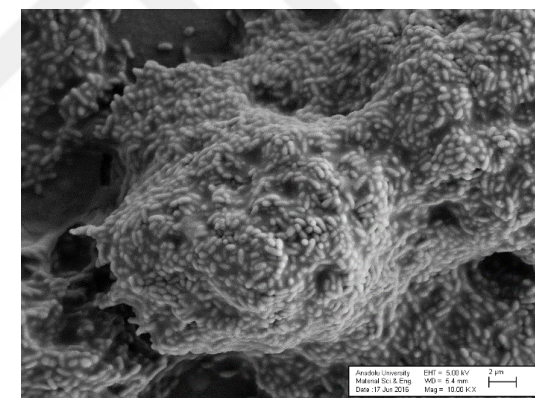
a



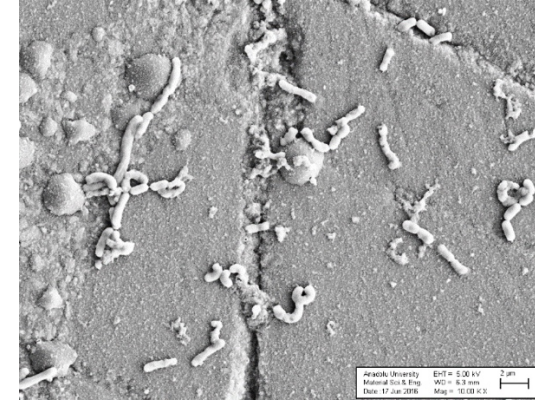
b



c

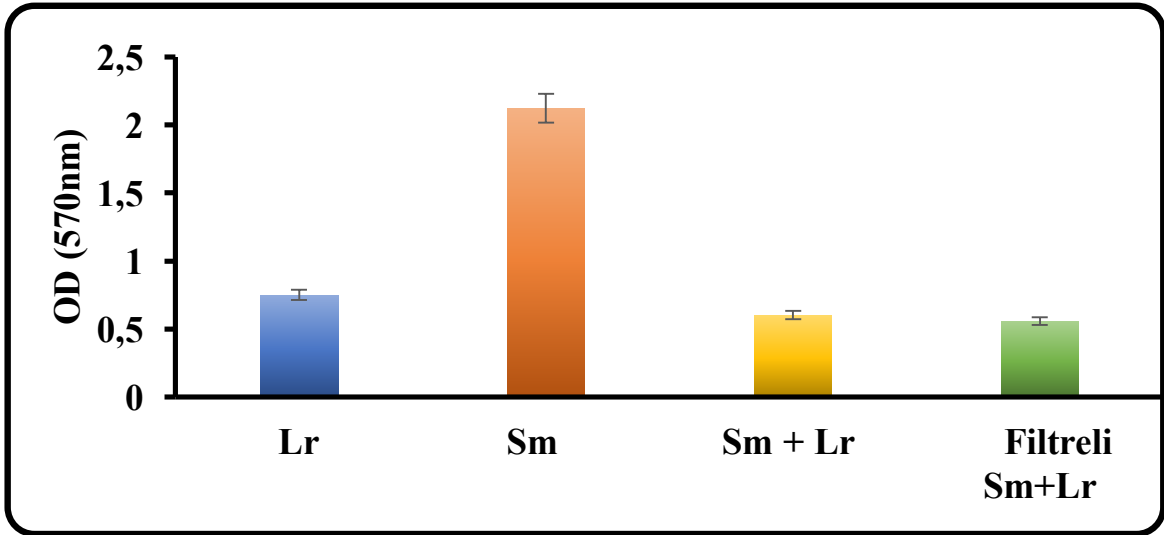


d

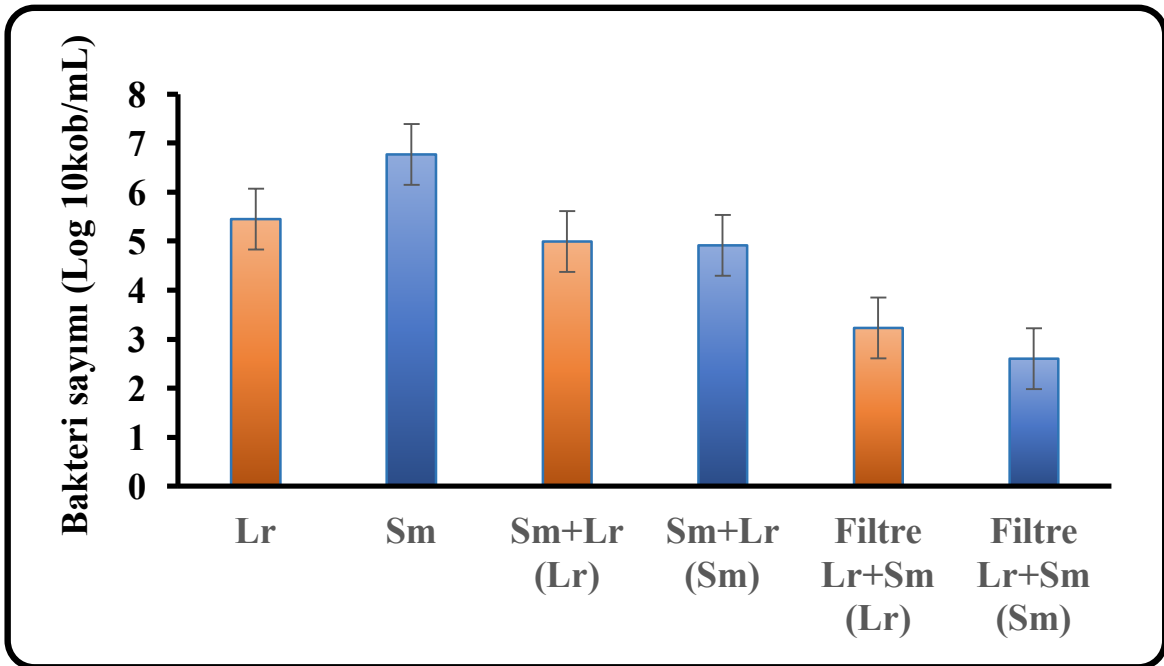


**Resim 4.13.** Clearfil Majesty ES 2 diskler üzerinde biyofilm oluşumuna *L.rhamnosus* 12' nin etkisinin SEM görüntüleri (X5000 ve X10000).;a. *L.rhamnosus* 12; b.*S.mutans* 1 c.*S.mutans* ve *L.rhamnosus* 12 birlikte uygulandığında ; d. *S.mutans* 1 ve filtre içine *L.rhamnosus* 12 uygulandığında.

Sonic fill 2 üzerinde *S.mutans* 1 biyofilm oluştururken *L.rhamnosus* 12' nin biyofilm oluşturması çok düşük olmuştur. *S.mutans* 1 ve *L.rhamnosus* 12 birlikte uygulandığında ve *L.rhamnosus* 12 filtre içinde uygulandığında biyofilm oluşumu düşük olmuştur. *L.rhamnosus* 12 *S.mutans* 1' in biyofilm oluşumu üzerine etkili olmuştur (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Sonic fill 2 disklerde *S. mutans* 1' in biyofilm oluşturması üzerine *L.rhamnosus* 12' nin etkisi.



Şekil 4.12. Sonic fill 2 diskler üzerinde biyofilm oluşturan canlı bakteri sayıları ( $\log_{10}$  kob /mL).

Biyofilmdeki *S.mutans* 1 ( $5,45 \pm 0,29 \log_{10}/\text{mL}$ ) sayısı yüksek olarak saptanmıştır. *S.mutans* 1 ve *L.rhamnosus* 12 birlikte uygulandığında *S.mutans* 1 ( $4,92 \pm 0,49 \log_{10}/\text{mL}$ ) sayısı düşmüştür. Filtreli uygulamada ise *L.rhamnosus*, *S.mutans* 1'in ( $2,60 \pm 0,68 \log_{10}/\text{mL}$ ) sayısında azalmaya neden olmuştur (Şeki 4.12). Yapılan Anova analizinde *S.mutans* 1 ve *L.rhamnosus* 12 birlikte uygulanması ve *L.rhamnosus* 12' nin filtre içine uygulanmasında *S.mutans* 1 sayıları ile *S.mutans*'in tek başına uygulandığı işlemdeki *S.mutans* 1 sayısı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur ( $p < 0,05$  sırası ile  $p = 0,028$  ve  $0,028$ ). SEM görüntüleri de bu bulgularla paralellik göstermiştir. *S.mutans* Sonic fill 2 üzerinde biyofilm oluşturmuştur. Bu görüntüler incelendiğinde biyofilmin üç boyutlu yapısı izlenmektedir (Resim 4.14 b). *L.rhamnosus* 12 uygulamalarında ise biyofilm oluşumu izlenmemektedir (Resim 4.14. c ve d).

Sonic fill 2' de ise uygulamaya başlamadan önceki Ra değeri  $0,090 \pm 0,016$  iken uygulamadan sonra Ra değerleri artmıştır (Tablo 4.14). *L.rhamnosus* 12 ve *S.mutans* 1 birlikte uygulandığı işlemde Ra değeri diğer uygulamalardan daha yüksek olmuştur.

Sonic fill 2 materyalinde uygulamalarda elde edilen son pH Tablo 4.15`de verilmiştir. *L.rhamnosus* 12 ve *S.mutans* 1 tek başına uygulandığı işlemlerde sırasıyla pH 3,97 ve 3,88 olarak ölçülmüştür. Birlikte uygulama işleminde son pH 3,91, filtre içine uygulamada ise 3,89 olarak ölçülmüştür.

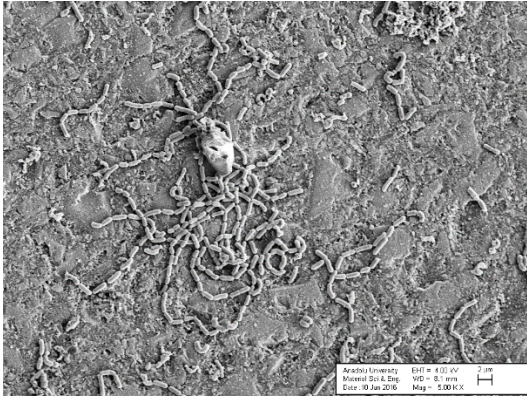
**Tablo 4.14.** Sonic fill 2 materyalinde uygulamadan önce ve uygulamadan sonraki pürüzlülük değerleri (Ra)

Uygulamadan önce		Uygulamadan sonra			
		Sm	Lr	Sm+Lr	Filtre Sm+Lr
Sonic fill II	$0,090 \pm 0,016$	$0,101 \pm 0,038$	$0,113 \pm 0,007$	$0,159 \pm 0,160$	$0,160 \pm 0,201$

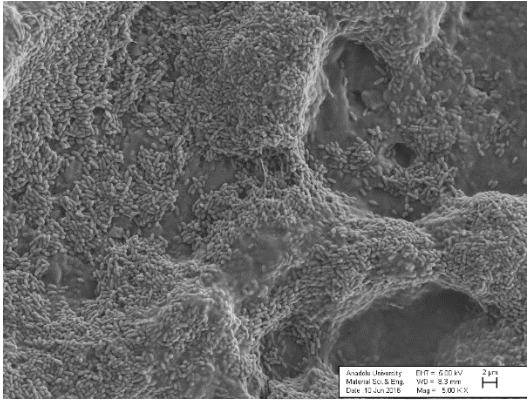
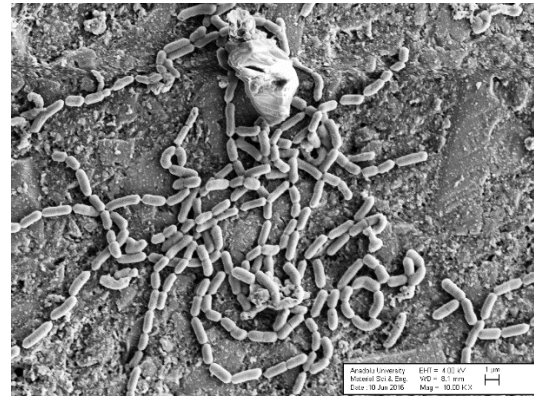
**Tablo 4.15.** Sonic fill 2 materyalinde uygulamalardan sonra elde edilen son pH değerleri

Uygulamalar	Lr	Sm	Lr + Sm (Lr)	Lr + Sm (Sm)	Filtre Lr + Sm (Lr)	Filtre Lr + Sm (Sm)
pH	3,97	3,88	3,91	3,91	3,89	3,89

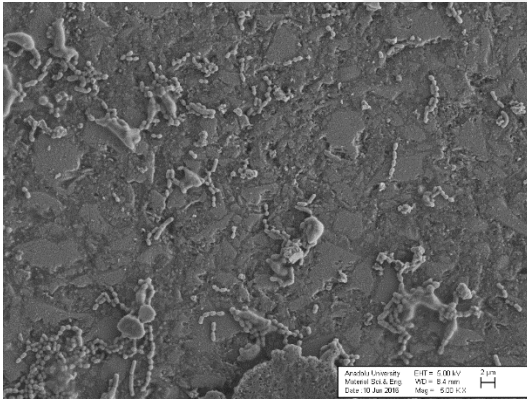
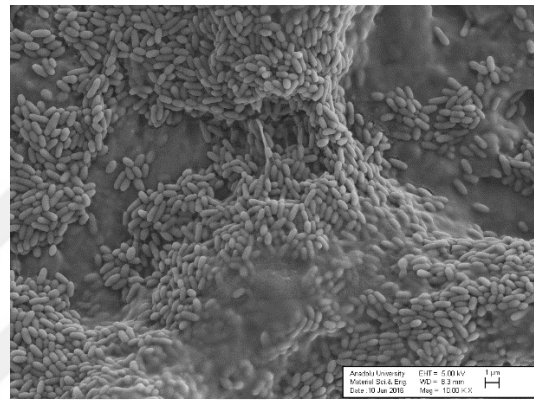




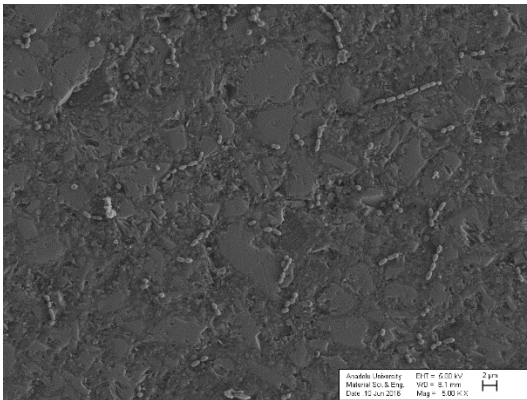
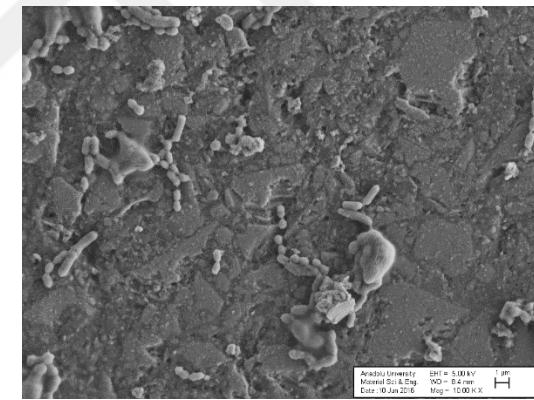
a



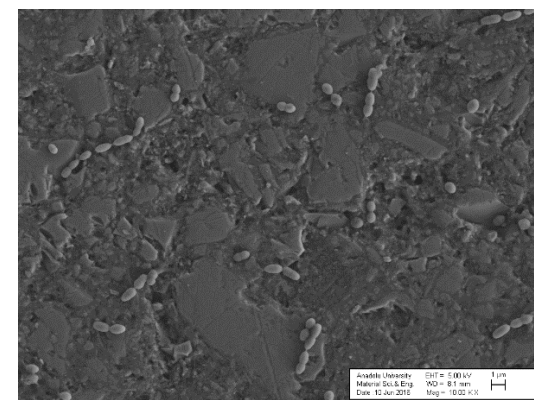
b



c

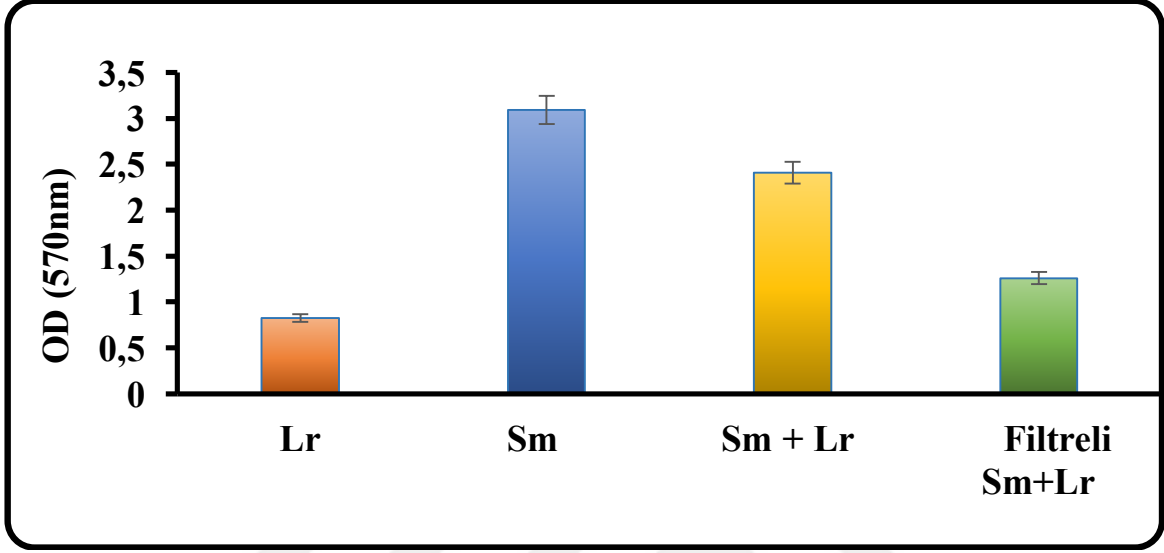


d

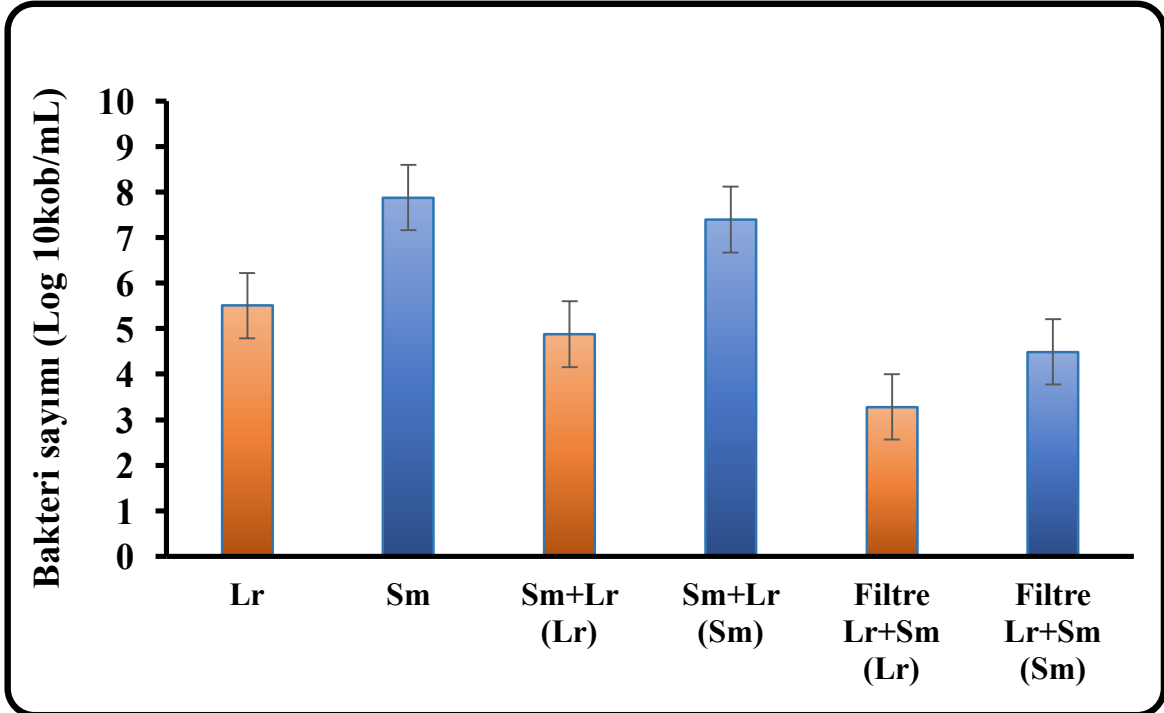


**Resim 4.14.** Sonic fill 2 diskler üzerinde biyofilm oluşumuna *L.rhamnosus* 12' nin etkisinin SEM görüntüleri (X5000 ve X10000).; **a.** *L.rhamnosus* 12; **b.** *S.mutans* 1 **c.** *S.mutans* ve *L.rhamnosus* 12 birlikte uygulandığında ; **d.** *S.mutans* 1 ve filtre içine *L.rhamnosus* 12 uygulandığında.

G-æniyal disklerde *L.rhamnosus* 12 düşük biyofilm oluştururken *S.mutans* 1 yüksek biyofilm oluşturmuştur. *S.mutans* 1 ve *L.rhamnosus* 12' nin birlikte uygulandığı işlemlerde biyofilm oluşumu yüksek olmuştur. *L.rhamnosus* 12' nin filtre içine uygulandığı işlemlerde ise biyofilm oluşumu azalmıştır (şekil 4.13)



şekil 4.13. G-æniyal disklerde *S.mutans* 1' in biyofilm oluşturması zerine *L.rhamnosus* 12' nin etkisi.



şekil 4.14. G-æniyal diskler üzerinde biyofilm oluşturucu canlı bakteri sayıları (log<sub>10</sub> kob /mL).

Biyofilmdeki bakteri sayıları da bu bulgulara paralel olmuştur. Biyofilmdeki *S.mutans* 1 ( $7,88 \pm 0,70 \log_{10}/\text{mL}$  ) sayısı yüksek olarak saptanmıştır. *S. mutans* 1 ve *L.rhamnosus* 12 birlikte uygulandığında *S. mutans* 1 sayısı  $7,39 \pm 0,47 \log_{10}/\text{mL}$  olmuştur. Filtreli uygulamada ise *L. rhamnosus* 12, *S. mutans* 1 ( $4,49 \pm 0,65 \log_{10}/\text{mL}$ ) sayısında azalmaya neden olmuştur (Şekil 4.14).

Annova testi ile yapılan analizde *S.mutans* 1 ve *L.rhamnosus* 12'nin birlikte uygulanması ile tek olarak *S. mutans* 1 uygulanması işlemlerinde bakteri sayımları arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık bulunmamıştır. Buna karşılık *L.rhamnosus* 12' nin filtre içine uygulanmasında *S.mutans* 1 sayımları ile diğer uygulamalardaki *S.mutans* 1 sayımları arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmuştur ( $p<0.05$ ).

SEM görüntülerinde biyofilm oluşumu ve üç boyutlu biyofilm görüntüsü resim 4.15'da verilmiştir. Bulgularla paralellik gösteren görüntüler elde edilmiştir. SEM görüntüleri incelenecek olursa *L. rhamnosus* 12' nin yüzeye adezyonunun düşük olduğu ve dağınık bir dağılım olduğu görülmektedir. *S.mutans* 1 ise yüksek bir adezyon göstererek biyofilm oluşturmuş ve biyofilmin üç boyutlu yapısı izlenmektedir. *S.mutans* 1 ve *L.rhamnosus* 12' nin birlikte uygulanması durumunda biyofilm oluşumunun azaldığı görülmektedir.

G-ænial materyalinde uygulamadan önce Ra değeri çok düşük iken uygulamalardan sonra Ra değeri artmıştır. İki bakterinin bulunduğu uygulamalarda Ra değeri daha yüksek olmuştur (Tablo 4.16).

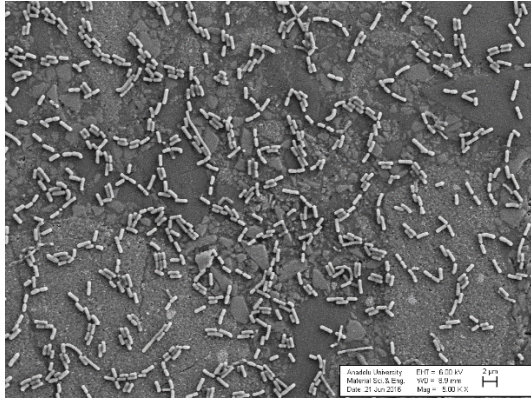
G-ænial materyalinde uygulamalarda elde edilen son pH değerleri Tablo 4.17' de verilmiştir. *L.rhamnosus* ve *S.mutans* tek başına uygulandığı işlemlerde sırasıyla pH 3,82 ve 4,00 olarak ölçülmüştür. Birlikte uygulama işleminde son pH 4,10, filtre içine uygulamada ise 3,90 olarak ölçülmüştür.

**Tablo 4.16.** G-æniyal materyalinde uygulamadan önce ve uygulamadan sonraki pürüzlülük değerleri (Ra)

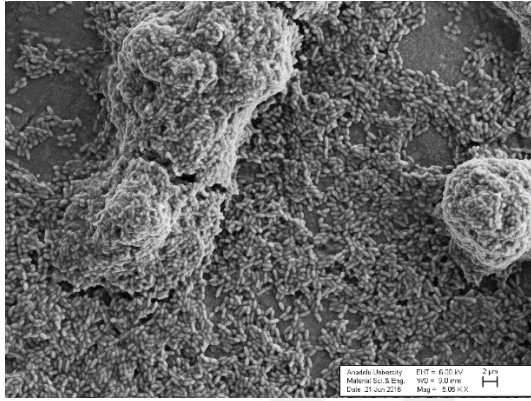
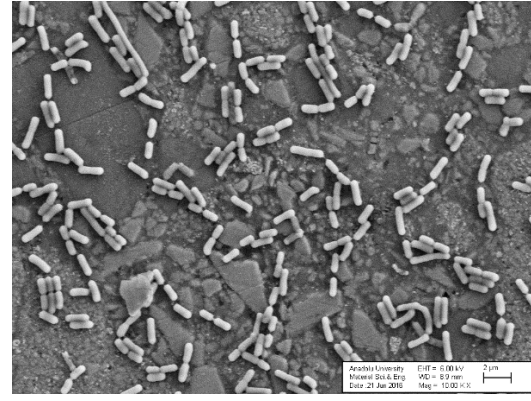
Uygulamadan önce		Uygulamadan sonra			
		Sm	Lr	Sm+Lr	Filtre Sm+Lr
G-æniyal	0,034±0,014	0,101±0,012	0,113±0,005	0,141±0,005	0,123±0,004

**Tablo 4.17.** G-æniyal materyalinde uygulamalardan sonra elde edilen son pH değerleri

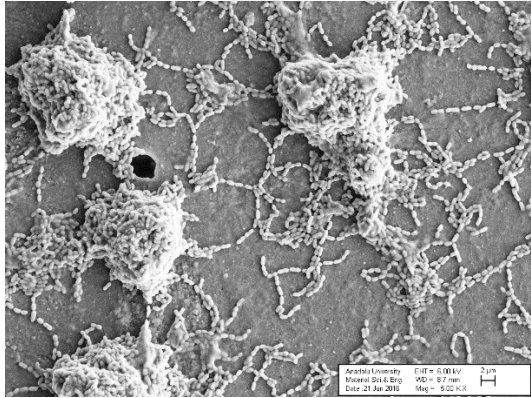
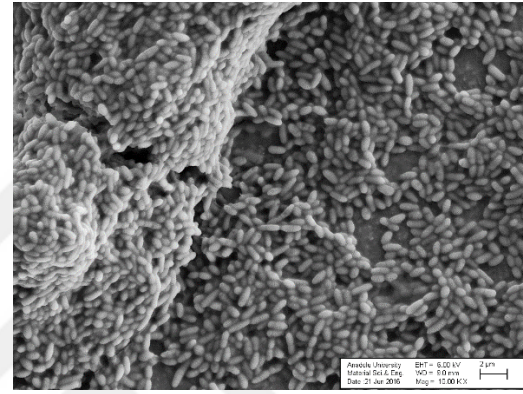
Uygulamalar	Lr	Sm	Lr + Sm (Lr)	Lr + Sm (Sm)	Filtre Lr + Sm (Lr)	Filtre Lr + Sm (Sm)
pH	3,82	4,00	4,10	4,10	3,90	3,90



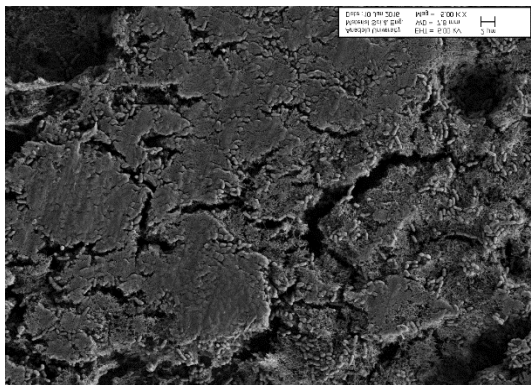
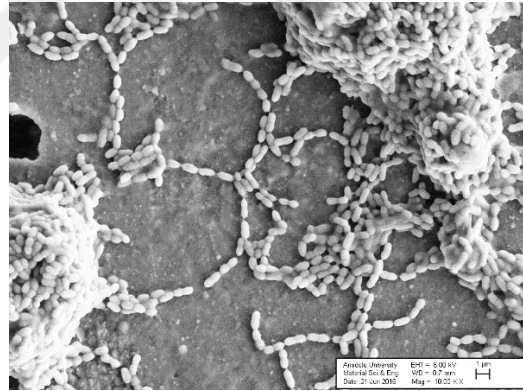
a



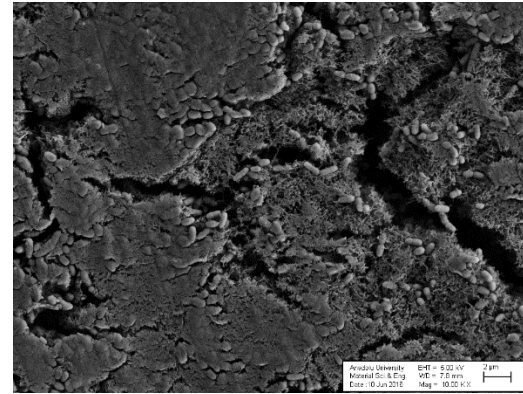
b



c

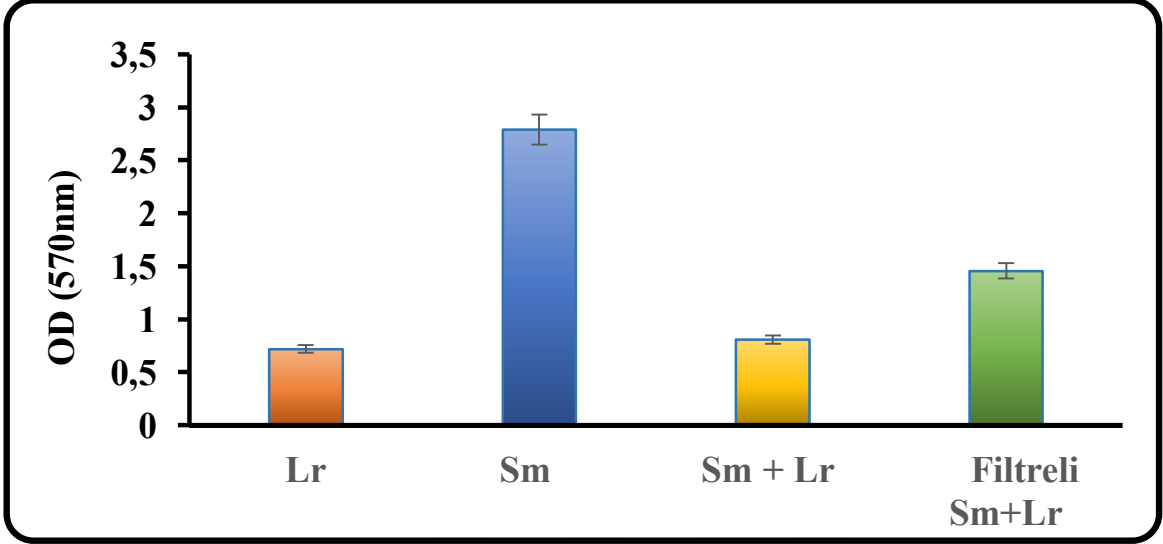


d

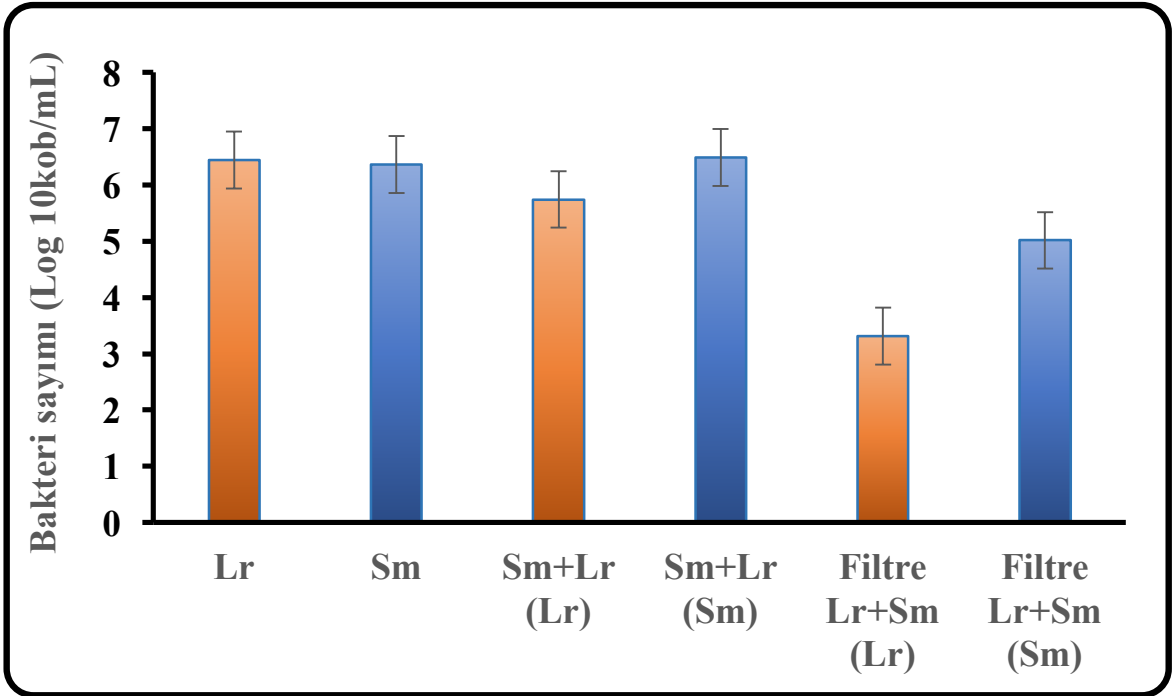


Resim 4.15. G-aenial diskler üzerinde biyofilm oluşumuna *L.rhamnosus* 12' nin etkisinin SEM görüntüleri (X5000 ve X10000).; **a.** *L. rhamnosus* 12; **b.** *S.mutans* 1 **c.** *S.mutans* ve *L.rhamnosus* 12 birlikte uygulandığında ; **d.** *S.mutans* 1 ve filtre içine *L.rhamnosus* 12 uygulandığında.

Ælite all purpose body disklerde *L.rhamnosus* 12 düşük biyofilm oluşumu gösterirken *S.mutans* 1 yüksek biyofilm oluşturmuştur (Şekil 4.15). *S.mutans* 1 ile *L.rhamnosus* 12 birlikte uygulandığında ve *L. rhamnosus* 12 filtre içine uygulandığında biyofilm oluşumu azalmıştır.



Şekil 4.15. Ælite all purpose body disklerde *S.mutans* 1' in biyofilm oluşurması üzerine *L.rhamnosus* 12' nin etkisi.



Şekil 4.16. Ælite all purpose body diskler üzerinde biyofilm oluşturan canlı bakteri sayıları ( $\log_{10}$  kob /mL).

Bakteri sayımları da spektrofotometrik değerlendirmeye benzer bulunmuştur. Bakteri sayımları açısından hem *L.rhamnosus* 12 ( $6,45 \pm 0,30 \log_{10}/\text{mL}$ ), hemde *S.mutans* 1 ( $6,36 \pm 0,62 \log_{10}/\text{mL}$ ) sayımları yüksek olarak bulunmuştur. Her iki bakterinin birlikte uygulandığı işlemde *S.mutans* 1 sayısı ( $6,49 \pm 0,30 \log_{10}/\text{mL}$ ) yüksekken, *L.rhamnosus* 12' nin filtre içine uygulandığı işlemde *S.mutans* sayısında ( $5,02 \pm 0,50 \log_{10}/\text{mL}$ ) düşme görülmüştür (Şekil 4.16).Yapılan annova testinde *S.mutans* 1 sayısı ile *S.mutans* 1' in *L.rhamnosus* 12 ile birlikte uygulandığında işlemdeki *S.mutans* 1 sayısı arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır. *L.rhamnosus* 12' nin filtre içine uygulandığı işlemdeki *S.mutans* 1 sayısı ile tek başına uygulanan *S.mutans* 1 sayısı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p<0.05$ ). *L.rhamnosus* 12' nin filtre içine uygulandığı işlemdeki *S.mutans* 1 ile *S.mutans* 1 ile *L.rhamnosus* 12' nin birlikte uygulandığında işlemdeki *S.mutans* 1 sayısı arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p<0.05$ ).

Ælite all purpose body disklerine ait SEM görüntüleri bu bulgulara tam olarak paralellik göstermektedir. *S.mutans* 1' in biyofilm oluşumu sayısal değerlere uygun olarak yüksek olarak bulunmuştur. Diskin üstü tamamen kaplanmış durumdadır. *L.rhamnosus* 12' nin bulunduğu işlemlere ait görüntülerde ise biyofilm oluşmadığı görülmektedir (Resim 4.16).

Ælite all purpose body disklerinin uygulamaya başlamadan önceki Ra değeri  $0,038 \pm 0,015$  iken uygulamadan sonra Ra değerleri artmıştır (Tablo 4.18).

*L.rhamnosus* 12 ve *S.mutans* 1 tek başına uygulandığı işlemlerde sırasıyla pH 3,94 ve 4,13 olarak ölçülmüştür. Birlikte uygulama işleminde son pH 3,99, filtre içine uygulamada ise 3,99 olarak saptanmıştır (Tablo 4.19).

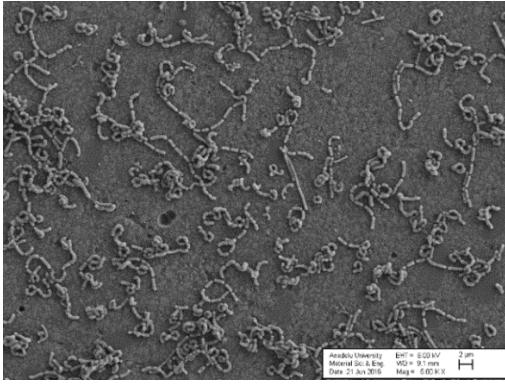
**Tablo 4.18.** Ælite all purpose body materyalinde uygulamadan önce ve uygulamadan sonraki pürüzlülük değerleri (Ra).

Uygulamadan önce		Uygulamadan sonra			
		Sm	Lr	Sm+Lr	Filtre Sm+Lr
Ælite all purpose body (Bisco)	0,038±0,015	0,088±0,003	0,072±0,217	0,055±0,024	0,047±0,007

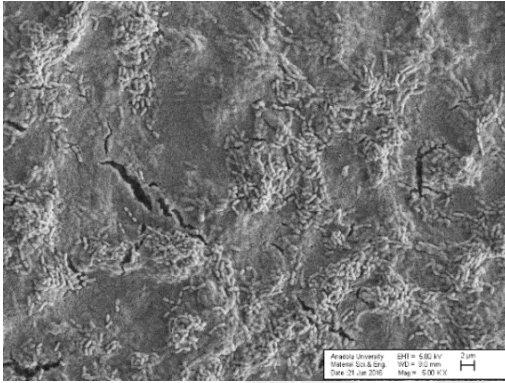
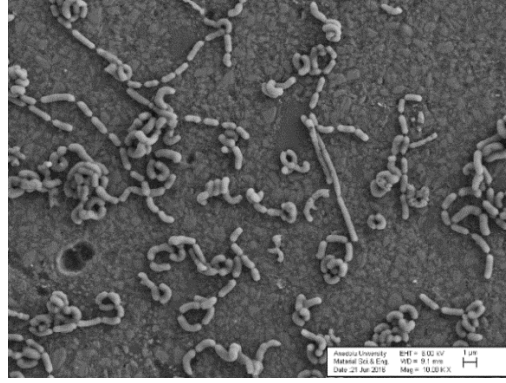
**Tablo 4.19.** Ælite all purpose body materyalinde uygulamalardan sonra elde edilen son pH değerleri

Uygulamalar	Lr	Sm	Lr + Sm (Lr)	Lr + Sm (Sm)	Filtre Lr + Sm (Lr)	Filtre Lr + Sm (Sm)
pH	3,94	4,13	3,99	3,99	3,99	3,99

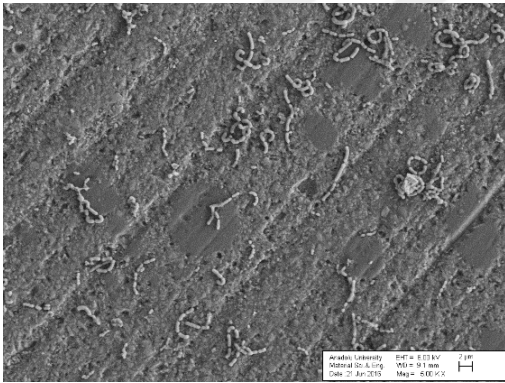
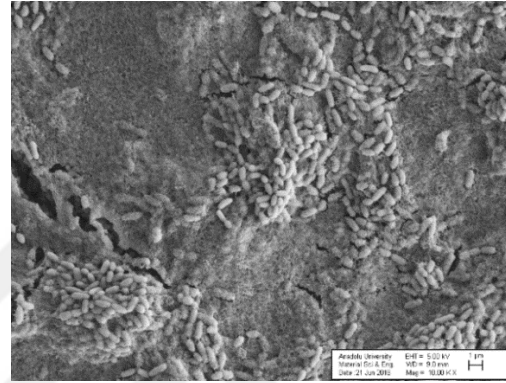




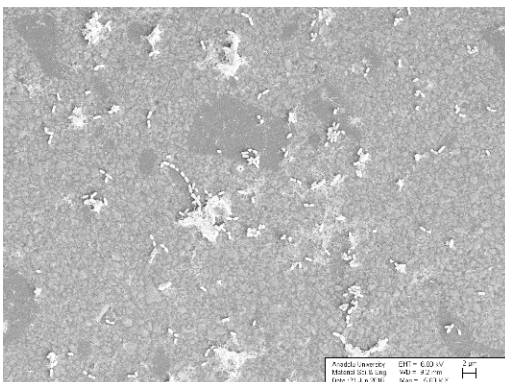
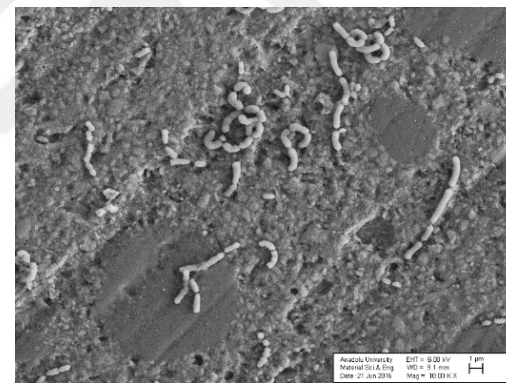
a



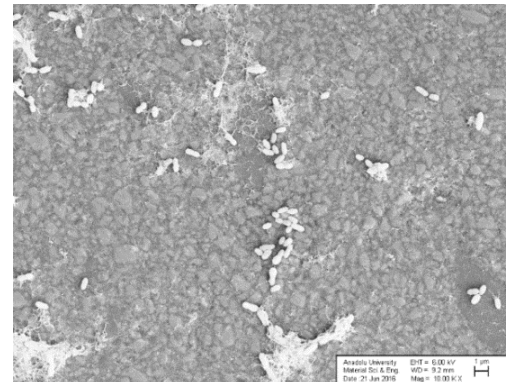
b



c

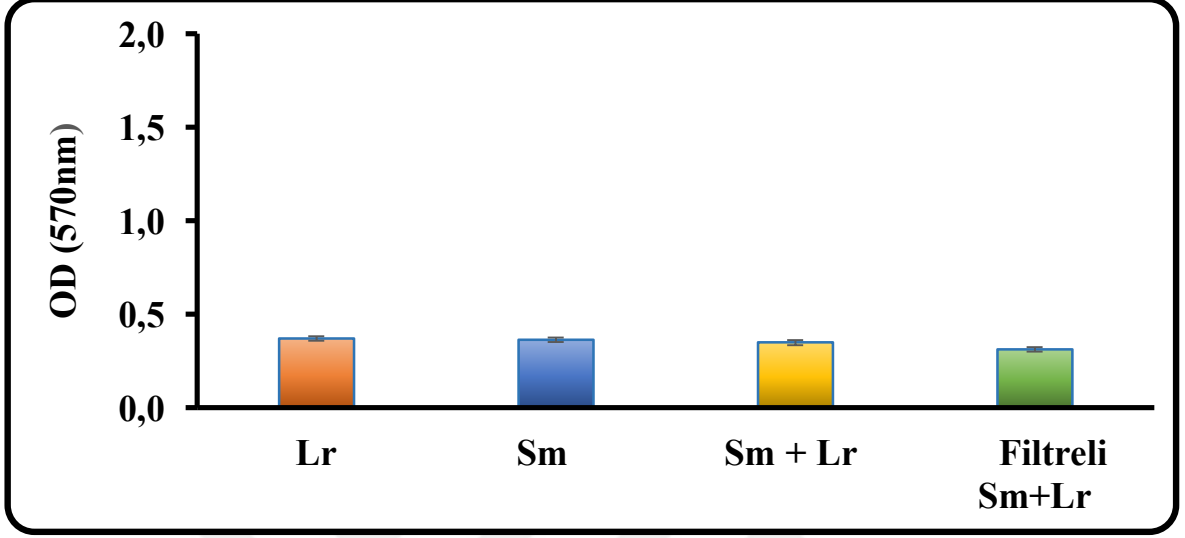


d

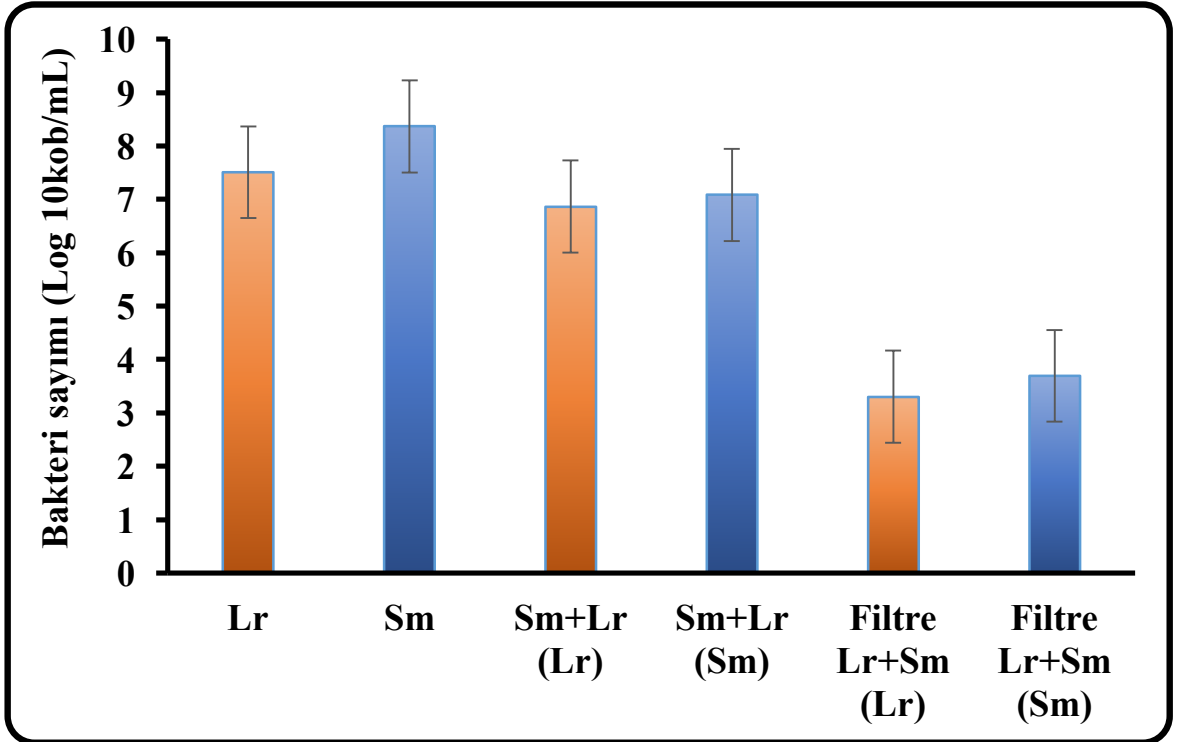


**Resim 4.16.** Ælite all purpose body diskler üzerinde biyofilm oluşumuna *L.rhamnosus* 12' nin etkisinin SEM görüntüleri (X5000 ve X10000); **a.** *L.rhamnosus* 12; **b.** *S.mutans* 1 **c.** *S.mutans* ve *L.rhamnosus* 12 birlikte uygulandığında ; **d.** *S.mutans* 1 ve filtre içine *L.rhamnosus* 12 uygulandığında.

Equia Forte ' den hazırlanan disklerde biyofilm oluşumunun kristal viyole ile boyanarak tayininde değişen oranlarda biyofim oluşumu saptanmıştır. Ancak oluşan bu biyofilm yoğunluğu çok düşük olarak belirlenmiştir (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. Equia Forte disklerde *S.mutans* 1' in biyofilm oluşturması üzerine *L.rhamnosus* 12' nin etkisi.



Şekil 4.18. Equia Forte diskler üzerinde biyofilm oluşturan canlı bakteri sayıları ( $\log_{10}$  kob /mL).

Diskler incelendiğinde hepsinin koyu mavi bir renkte olduğu görülmüştür. Glasiyel asetik asit ile biyofilmin kaldırılma işleminde boyanın büyük bir kısmının disk üzerinde kaldığı görülmüştür. Bu durum gerek bakteri sayımları ve gerekse SEM görüntülerinde de belirlenmiştir. Biyofilmin spektrofotometrik değerlendirmesi ile bakteri sayımları uyumlu çıkmamıştır.

*S.mutans* 1 tek başına uygulandığında disk üzerindeki bakteri sayısı  $8,38 \pm 0,19 \log_{10}/\text{mL}$  iken *S.mutans* 1 ve *L.rhamnosus* 12 birlikte uygulandığında biyofilm içindeki *S.mutans* 1 sayısı  $7,08 \pm 0,50 \log_{10}/\text{mL}$  ye düşmüştür. *L.rhamnosus* 12 filtre içinde uygulandığında ise daha etkili olmuştur. *S.mutans* 1 sayısı  $3,69 \pm 0,77 \log_{10}/\text{mL}$  ye düşmüştür (Şekil 4.17). Yapılan Anova testinde gruplar arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). Her iki bakterinin birlikte uygulandığı ve *L.rhamnosus* 12' nin filtre içine uygulandığı işlemlerdeki *S.mutans* 1 sayısı ile tek başına uygulandığı işlemdeki *S.mutans* 1 sayısı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur ( $p < 0,05$  sırası ile  $p = 0,046$  ve  $0,028$ ).). Her iki bakterinin birlikte uygulandığı ve *L.rhamnosus* 12' nin filtre içine uygulandığı işlemlerdeki *S.mutans* 1 sayısı arasında da istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık bulunmuştur ( $p < 0,05$   $p = 0,028$ ).

SEM görüntüleri resim 4.18' de verilmiştir. *S.mutans* 1' in biyofilm oluşumu ve üç boyutlu yapısı gözlenmiştir (Resim 4.17.b). *L.rhamnosus* 12' nin bulunduğu uygulamalarda ise biyofilmin oluşmadığı tek tabaka halinde olduğu görülmüştür.

Equia Forte materyalinde uygulamadan önce Ra değeri  $0,418 \pm 0,188$  olarak saptanmıştır. *S.mutans* 1 ve *L.rhamnosus* 12' nin birlikte uygulandığı koşullarda Ra değerleri  $1,045 \pm 0,060$  ve  $1,319 \pm 0,206$  olarak bulunmuştur (Tablo 4.20).

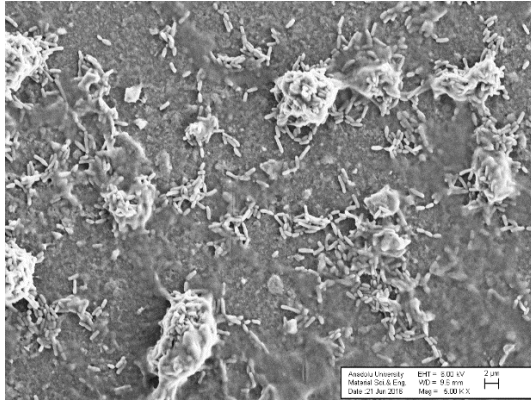
Equia Forte materyalinde uygulamalarda elde edilen son pH değerleri Tablo 4.21'de verilmiştir. *L.rhamnosus* 12 ve *S.mutans* 1 tek başına uygulandığı işlemlerde sırasıyla pH 5,00 ve 4,18 olarak ölçülmüştür. Birlikte uygulama işleminde son pH 4,15, filtre içine uygulamada ise 4,12 olarak saptanmıştır.

**Tablo 4.20.** Equia Forte materyalinde uygulamadan önce ve uygulamadan sonraki pürüzlülük değerleri (Ra).

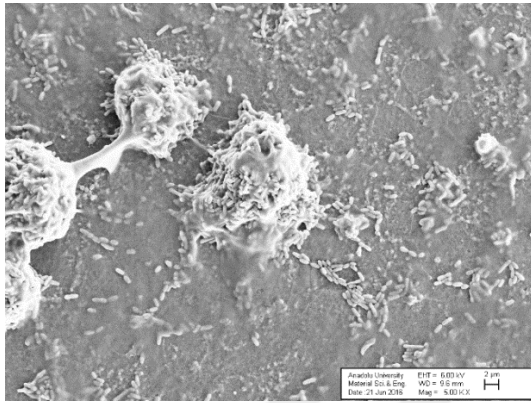
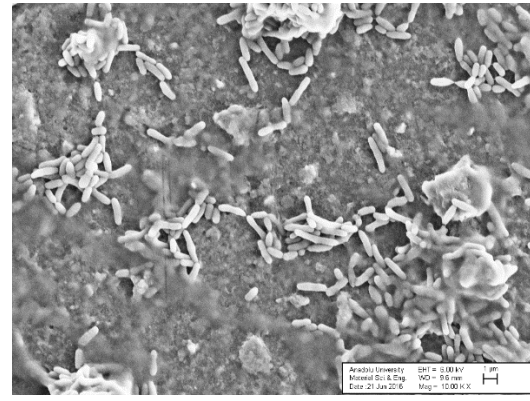
Uygulamadan önce		Uygulamadan sonra			
		Sm	Lr	Sm+Lr	Filtre Sm+Lr
Equia Forte	0,418±0,188	0,514±0,298	0,435±0,024	0,645±0,060	0,619±0,206

**Tablo 4.21.** Equia Forte materyalinde uygulamalardan sonra elde edilen son pH değerleri

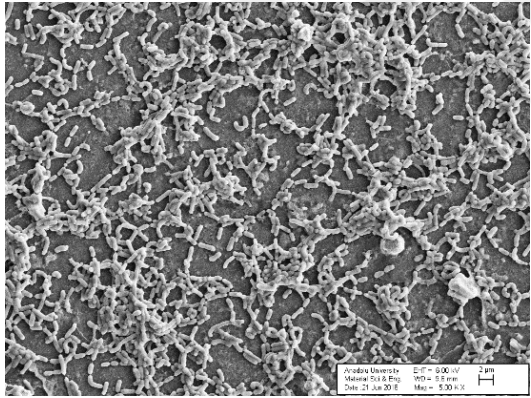
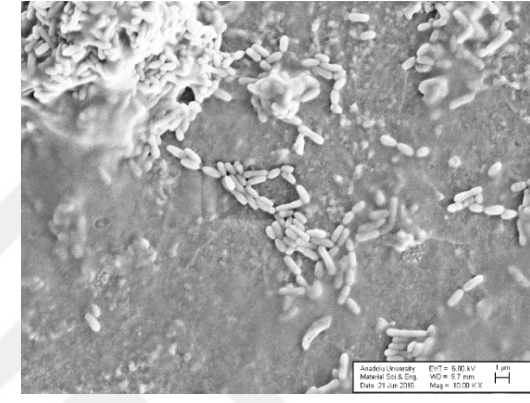
Uygulamalar	Lr	Sm	Lr + Sm (Lr)	Lr + Sm (Sm)	Filtre Lr + Sm (Lr)	Filtre Lr + Sm (Sm)
pH	5,00	4,18	4,15	4,15	4,16	4,16



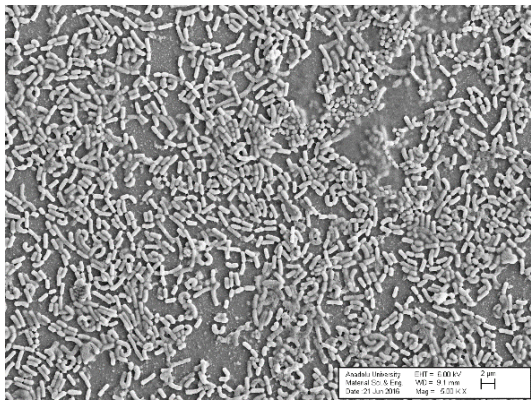
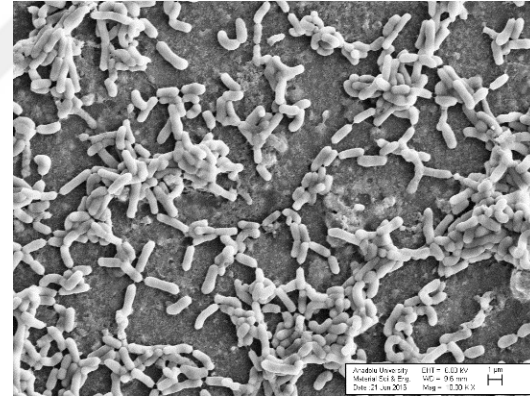
a



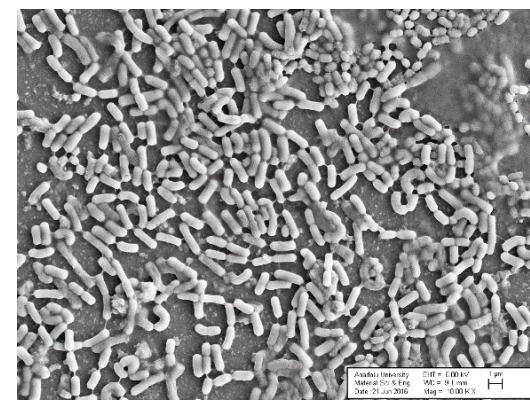
b



c

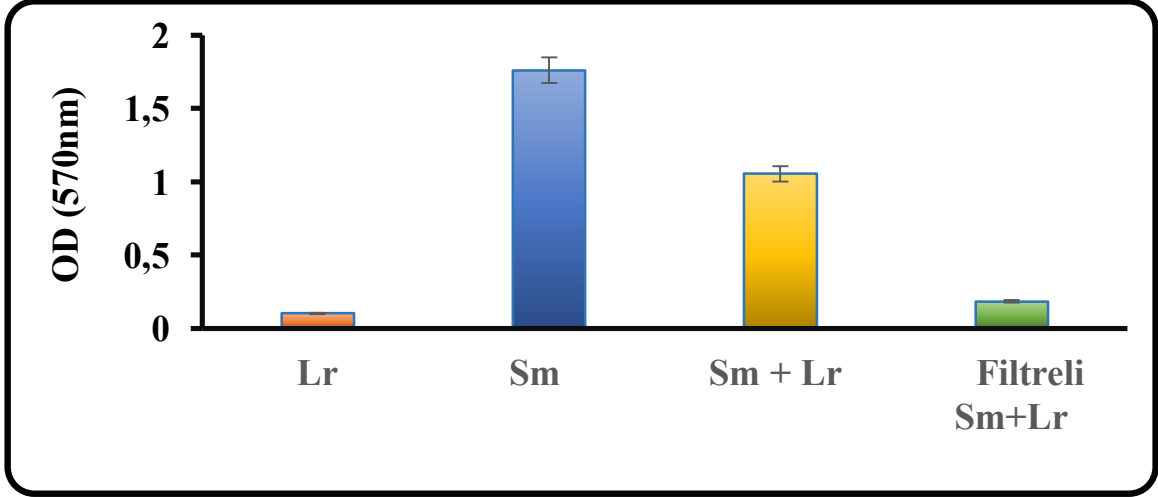


d

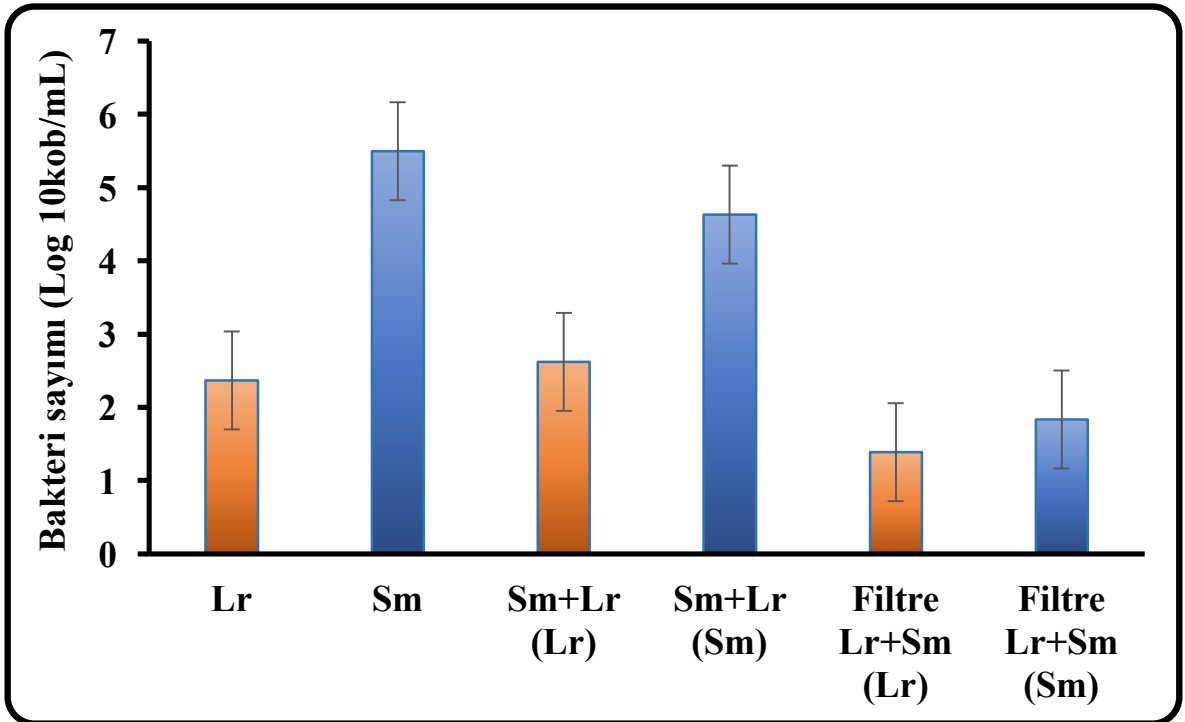


**Resim 4.17.** Equia Forte diskler üzerinde biyofilm oluşumuna *L.rhamnosus* 12' nin etkisinin SEM görüntüleri (X5000 ve X10000);**a.** *L.rhamnosus* 12; **b.** *S.mutans* 1 **c.** *S. mutans* ve *L.rhamnosus* 12 birlikte uygulandığında ; **d.** *S.mutans* 1 ve filtre içine *L.rhamnosus* 12 uygulandığında.

Emax diskler üzerinde *S.mutans* 1 yüksek biyofilm oluştururken ve *L.rhamnosus* 12 biyofilm oluşturmamıştır. Gerek bakterilerin bir arada uygulandığı ve gerekse *L.rhamnosus* 12' nin filtre içine uygulandığı işlemlerde biyofilm oluşumu düşük olmuştur. Spektrofotometrik ölçüm ve bakteri sayımları birbirine paralel sonuçlar vermiştir (Şekil 4.19)



Şekil 4.19. Emax disklerde *S.mutans* 1' in biyofilm oluşturması üzerine *L.rhamnosus* 12' nin etkisi.



Şekil 4.20. Emax diskler üzerinde biyofilm oluşturan canlı bakteri sayıları ( $\log_{10}$  kob /mL).

*S.mutans* sayısı  $5,50 \pm 0,70 \log_{10}/\text{mL}$  ten bakterilerin birlikte uygulandığı işlemde  $4,63 \pm 0,87 \log_{10}/\text{mL}$  ye düşerken *L.rhamnosus* 12' nin filtre içine uygulandığı işlemde  $1,84 \pm 0,57 \log_{10}/\text{mL}$  ye düşmüştür (Şekil 4.19). Anova testinde gruplar arasında önemli bir farklılık bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). *S.mutans* 1 ve *L.rhamnosus* 12 birlikte uygulandığında ve filtre içinde *L.rhamnosus* 12 uygulandığında *S.mutans* 1 sayımları *S.mutans* 1' in tek başına uygulandığı işlemdeki *S.mutans* sayısı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur ( $p < 0,05$  sırası ile  $p = 0,046$  ve  $0,028$ ). Bakterilerin birlikte uygulandığı işlemdeki *S.mutans* 1 sayımları ile *L.rhamnosus* 12' nin filtre içine uygulandığında *S.mutans* 1 sayımları arasındada istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur ( $p < 0,05$   $p = 0,028$ ).

SEM görüntüleri de bu bulguları doğrulamıştır. *S.mutans* 1 yüksek biyofilm oluşumu gösterirken diğer işlemlerde biyofilm oluşumu görülmemiştir (Resim 4.18).

Emax materyalinde uygulamadan önce Ra değeri çok düşük iken uygulamalardan sonra Ra değeri artmıştır. İki bakterinin bulunduğu uygulamalarda Ra değeri daha yüksek olmuştur (Tablo 4.22).

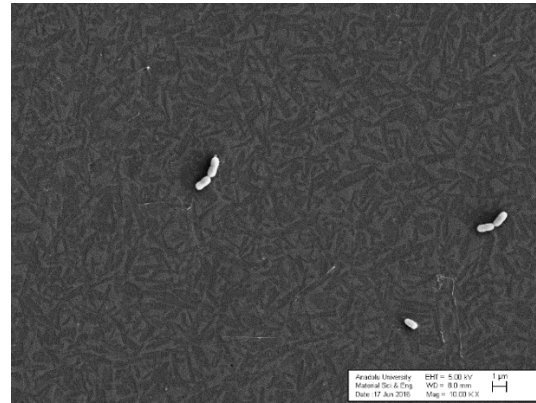
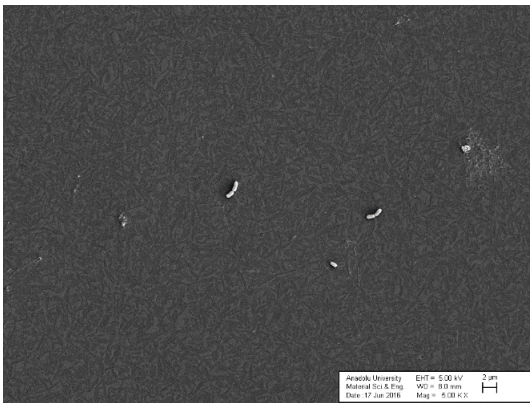
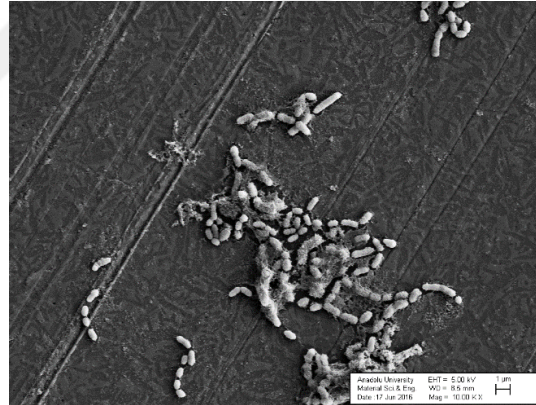
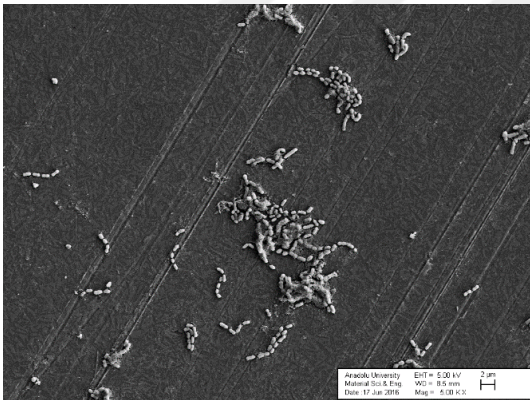
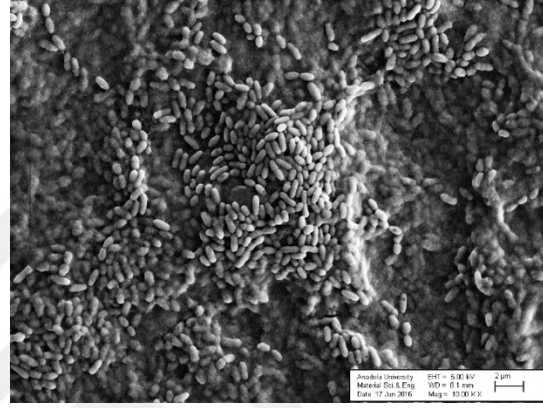
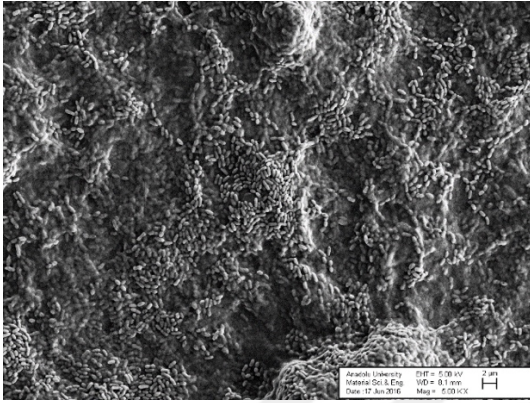
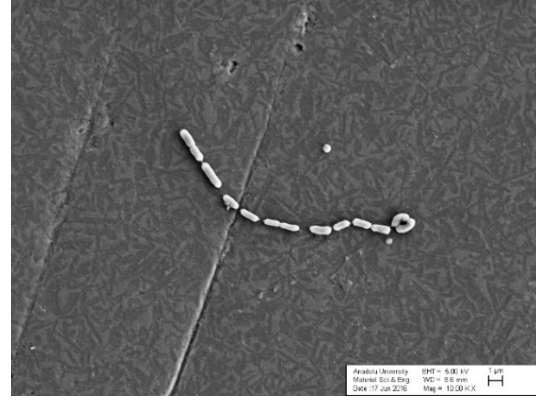
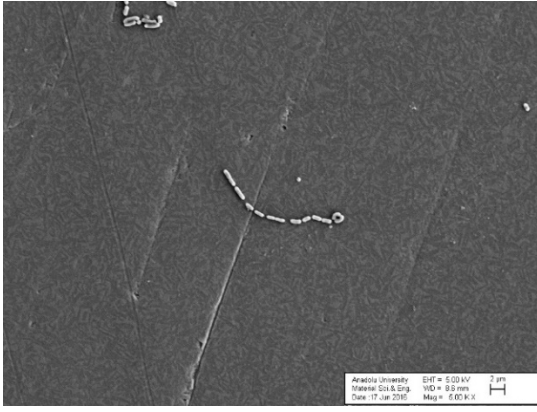
Emax materyalinde uygulamalarda elde edilen son pH değerleri Tablo 4.23' de verilmiştir. *L.rhamnosus* 12 ve *S.mutans* 1 tek başına uygulandığı işlemlerde sırasıyla pH 3,98 ve 4,15 olarak ölçülmüştür. Birlikte uygulama işleminde son pH 4,01 filtre içine uygulamada ise 4,23 olarak saptanmıştır.

**Tablo 4.22.** Emax materyalinde uygulamadan önce ve uygulamadan sonraki pürüzlülük değerleri (Ra).

Uygulamadan önce		Uygulamadan sonra			
		Sm	Lr	Sm+Lr	Filtre Sm+Lr
Emax	0,015±0,006	0,038±0,021	0,027±0,015	0,047±0,036	0,018±0,007

**Tablo 4.23.** Emax materyalinde uygulamalardan sonra elde edilen son pH değerleri

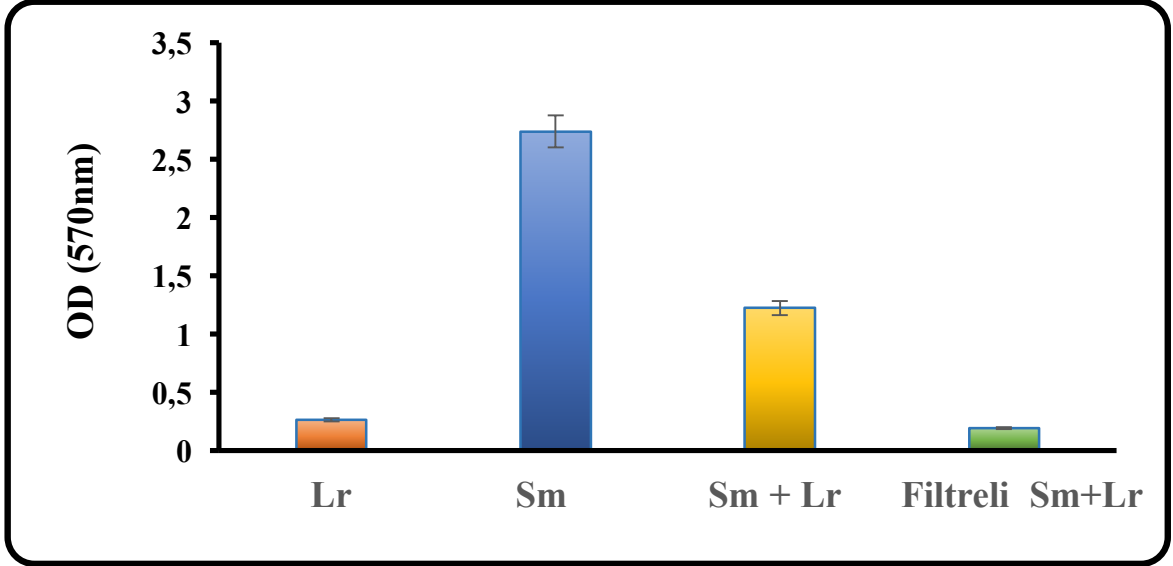
Uygulamalar	Lr	Sm	Lr + Sm (Lr)	Lr + Sm (Sm)	Filtre Lr + Sm (Lr)	Filtre Lr + Sm (Sm)
pH	3,98	4,15	4,01	4,01	4,23	4,23



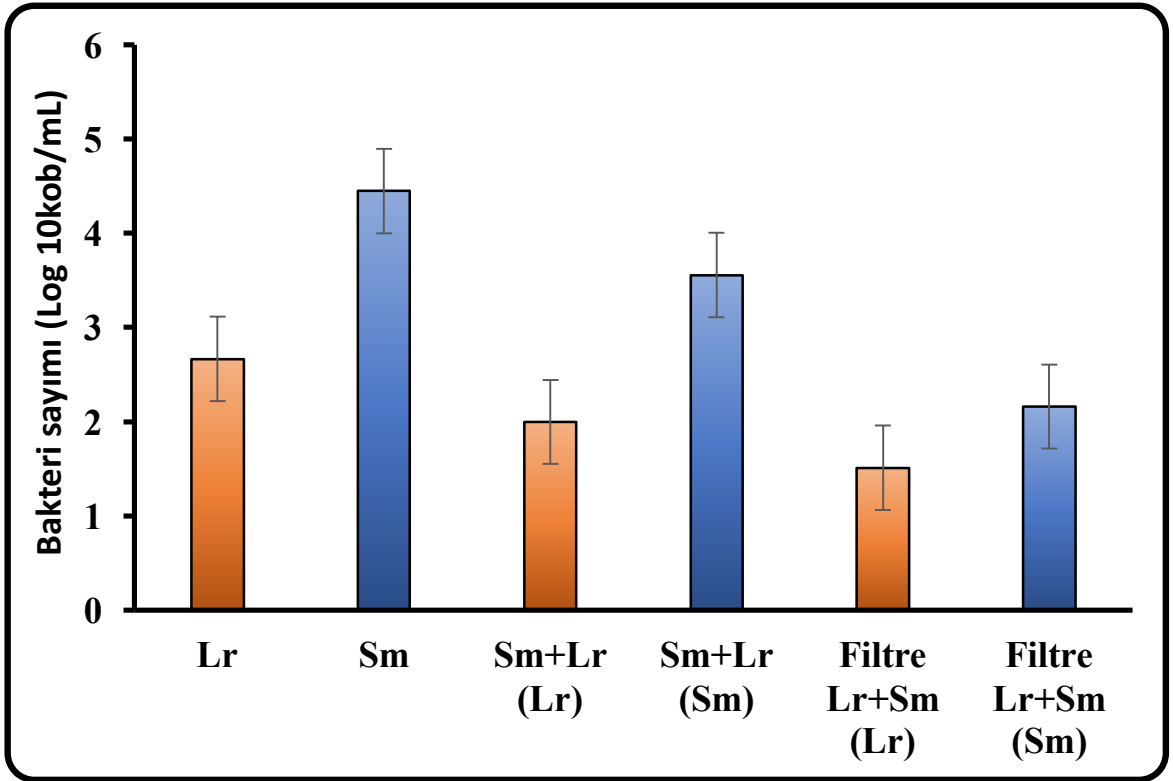
**Resim 4.18.** Emax diskler üzerinde biyofilm oluşumuna *L.rhamnosus* 12' nin etkisinin SEM görüntüleri (X5000 ve X10000).; **a.** *L.rhamnosus* 12; **b.** *S.mutans* 1 **c.** *Smutans* 1 ve *L.rhamnosus* 12 birlikte uygulandığında ; **d.** *S.mutans* 1 ve filtre içine *L.rhamnosus* 12 uygulandığında.



Lava disklerinde *S.mutans* 1 yüksek biyofilm oluştururken *L.rhamnosus* 12 biyofilm oluşturmamıştır. *L.rhamnosus* 12 ilavesi biyofilm oluşumunu azaltmıştır (Şekil 4.21).



Şekil 4.21. Lava disklerde *S.mutans* 1'in biyofilm oluşturması üzerine *L.rhamnosus* 12'nin etkisi.



Şekil 4.22. Lava diskler üzerinde biyofilm oluşturan canlı bakteri sayıları ( $\log_{10}$  kob /mL).

Lava disklerde *S.mutans* 1 sayısı  $4,45 \pm 0,24 \log_{10}/\text{mL}$  ten bakterilerin birlikte uygulandığı işlemde  $3,55 \pm 0,26 \log_{10}/\text{mL}$  ye düşerken *L.rhamnosus* 12'nin filtre içine uygulandığı işlemde  $2,16 \pm 0,48 \log_{10}/\text{mL}$  ye düşmüştür ( Şekil 4.22). Anova testinde gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). *S.mutans* 1 ve *L.rhamnosus* 12 birlikte uygulandığında ve filtre içinde *L.rhamnosus* 12 uygulandığında *S.mutans* 1 sayımları *S.mutans* 1' in tek başına uygulandığı işlemdeki *S.mutans* 1 sayısı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur ( $p < 0,05$  sırası ile  $p = 0,028$  ve  $0,028$ ). Bakterilerin birlikte uygulandığı işlemdeki *S.mutans* 1 sayımları ile *L.rhamnosus* 12'nin filtre içine uygulandığında *S.mutans* 1 sayımları arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur ( $p = 0,028$ ).

SEM görüntüleri de bu bulguları doğrulamıştır. *S.mutans* 1 yüksek biyofilm oluşumu gösterirken diğer işlemlerde biyofilm oluşumu görülmemiştir (Resim 4.19).

Lava materyalinde uygulamadan önce Ra değeri çok düşük iken uygulamalardan sonra Ra değeri artmıştır. İki bakterinin bulunduğu uygulamalarda Ra değeri daha yüksek olmuştur (Tablo 4.24).

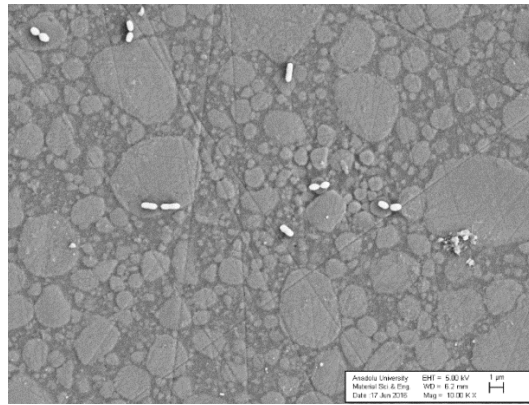
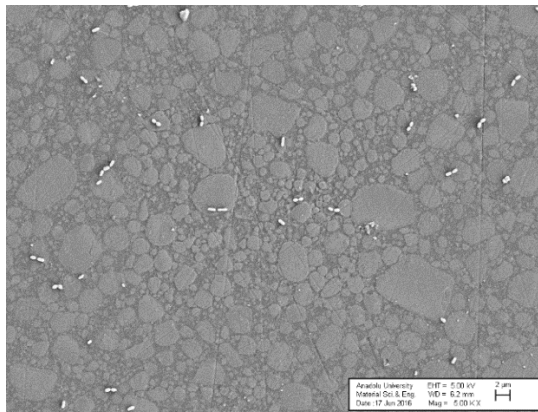
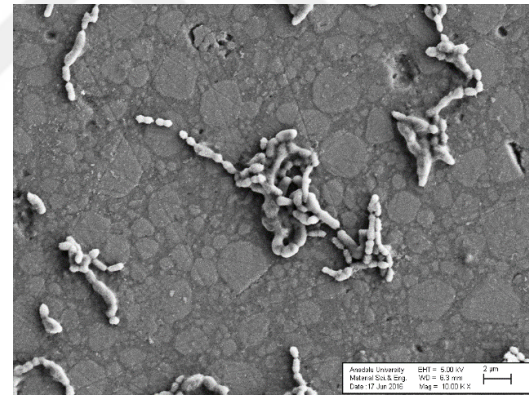
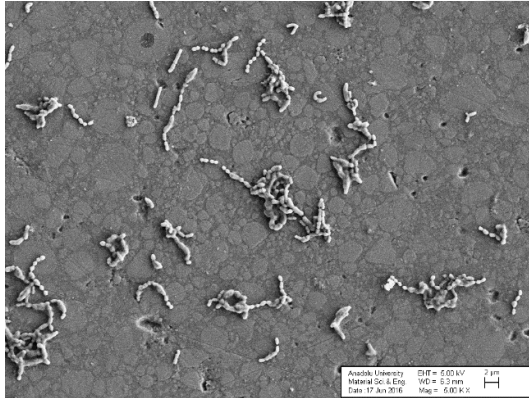
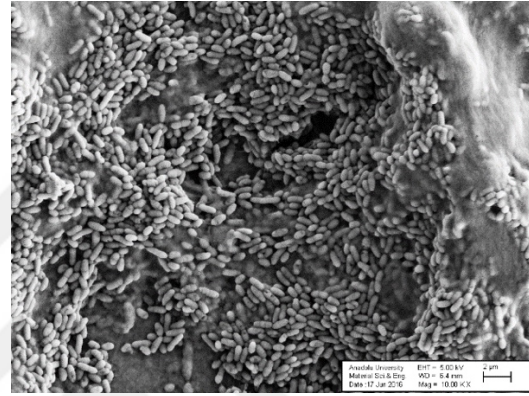
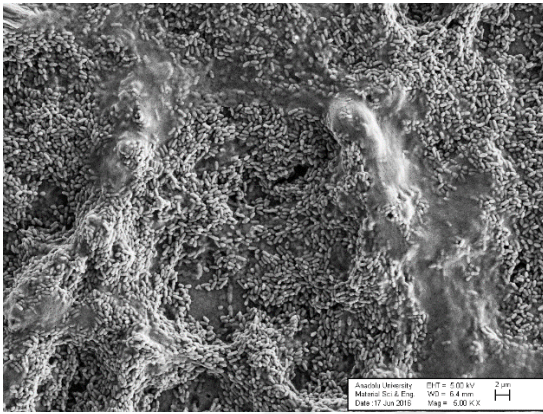
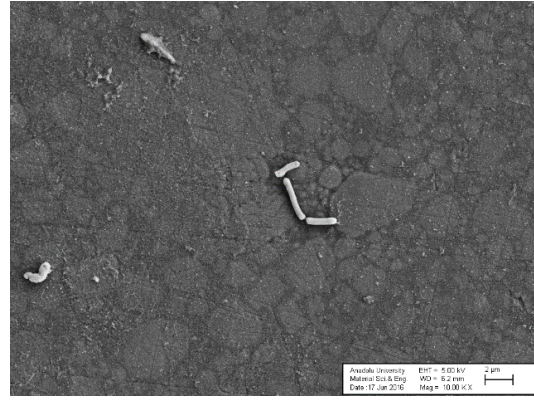
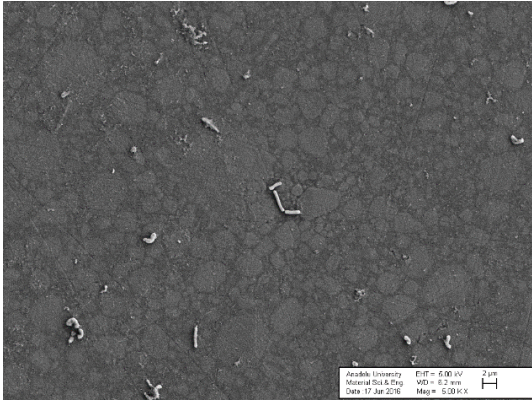
Lava materyalinde uygulamalarda elde edilen son pH değerleri Tablo 4.25`da verilmiştir. *L.rhamnosus* 12 ve *S.mutans* 1 tek başına uygulandığı işlemlerde sırasıyla pH 4,02 ve 4,11 olarak ölçülmüştür. Birlikte uygulama işleminde son pH 4,04, filtre içine uygulamada ise 4,14 olarak saptanmıştır.

**Tablo 4.24.** Lava materyalinde uygulamadan önce ve uygulamadan sonraki pürüzlülük değerleri (Ra).

Uygulamadan önce		Uygulamadan sonra			
		Sm	Lr	Sm+Lr	Filtre Sm+Lr
Lava	0,024±0,013	0,035±0,013	0,031±0,021	0,049±0,021	0,037±0,023

**Tablo 4.25.** Lava materyalinde uygulamalardan sonra elde edilen son pH değerleri

Uygulamalar	Lr	Sm	Lr + Sm (Lr)	Lr + Sm (Sm)	Filtre Lr + Sm (Lr)	Filtre Lr + Sm (Sm)
pH	4,02	4,11	4,04	4,04	4,14	4,14



**Resim 4.19.** Lava diskler üzerinde biyofilm oluşumuna *L.rhamnosus* 12' nin etkisinin SEM görüntüleri (X5000 ve X10000); **a.** *L.rhamnosus* 12; **b.** *S.mutans* 1 **c.** *S.mutans* 1 ve *L.rhamnosus* 12 birlikte uygulandığında ; **d.** *S.mutans* 1 ve filtre içine *L.rhamnosus* 12 uygulandığında.

## 5. TARTIŞMA

Biyofilm, bir yüzeye yapışarak, belirli bir yapısal bütünlük içerisinde toplu halde yaşayan ve birbirleriyle haberleşerek varlıklarının devamı için gerekli işlevlerin yerine getirilmesini sağlayan bakterilerin oluşturduğu karmaşık bir organizasyondur. Dental plak ‘doğal biyofilm’ olarak tanımlanabilir (191). Dental biyofilm kompleks ve dinamik bir ekosistem olup diş çürüklerinin ve periodontal hastalıkların gelişmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Son 40 yıldır oral biyofilmlerle ilgili önemli çalışmalar yapılan geniş çaplı olan araştırmalarla; dental biyofilmin yapısı, bakteriyel içeriği, bakteriyel tutunma mekanizmaları, immun yanıtları gibi konular incelenmiştir. Dental biyofilm çok sayıda bakteri içermesi nedeniyle karışık bir yapıya sahiptir (104, 192, 193, 194). Diş dokuları üzerinde biyofilm oluştuğu gibi restoratif materyaller üzerinde de biyofilm oluşmaktadır. Buna bağlı olarak restoratif materyal ile diş dokuları arasında sekonder çürükler oluşmaktadır (195). Oral biyofilmin kontrolü ile diş çürüklerinin engellenmesine yönelik bir çok çalışma yapılmıştır (16, 196, 197). Diş plaklarının oluşturduğu hastalıkların önlenmesinde temel yöntem plağın mekanik olarak uzaklaştırılmasıdır. Yeni tedavi yaklaşımlarından biri de spesifik mikroorganizmalar ile plak oluşturan bakterilerin inhibe edilmesidir. Bu spesifik mikroorganizmalar probiyotik bakterilerdir. Günümüzde ağız sağlığı açısından biyofilm kontrolünde önemli bir rol oynayan probiyotik bakterilere ilgi giderek artmaktadır (198).

Bu çalışmada probiyotik özelliği gösteren laktik asit bakterilerinin restoratif materyallere tutunan *S.mutans* 1’in biyofilm oluşturması üzerine olan antibiyofilm aktiviteleri incelenmiştir.

Çalışmamızda kullandığımız patojen bakterilerin ve probiyotik bakterilerin tanımlanması için biyokimyasal ve moleküler testler yapılmıştır. Patojen bakteriler 16S rRNA dizi analizine göre ise test izolatlarından 4’ ü *S.mutans*, 2’ si *S.anginosus*, 1’ i *S.salivarius*, 1’ i *S.sanguinis*, 1’ i *S.constellatus*, 2’ si *E.faecium* olarak belirlenmiştir. Probiyotik laktik asit bakterilerinin 4’ ü de *L.rhamnosus* olarak tanımlanmıştır. Bu yöntemlerle çalışmamızda kullanılacak patojen biyofilm bakterileri ile antibiyofilm özelliğine sahip probiyotik bakteriler belirlenmiştir. Bu bakterilerden patojen özellik gösteren bakteri ile en yüksek antibiyofilm etkinliği gösteren probiyotik bakteriyi belirlemek için testler uygulanmıştır. Ağız ortamına alınan farklı tipteki karbonhidratların

hangisi ile hangi bakterinin ne kadar biyofilm oluşturduğunu belirlemek için farklı şeker tipleri kullanılmıştır. Benzer çalışmalarda çoğunlukla *S.mutans* test bakterisi olarak kullanılmıştır (197,199, 200). Bizim çalışmamızda da *S.mutans*'ın 4 farklı suşu seçilmiş ve bunların arasından, *S.mutans* 1 ve *S.mutans* 8 şekerlerin hepsinde biyofilm oluşturmuştur. *S.mutans* 1 test edilen farklı şekerler içinde en yüksek biyofilmi sükrözde oluşturduğu için karbon kaynağı olarak da sükröz kullanılmıştır (Şekil 4.2). Test bakterilerine antibiyotiğe direnç testi yapılmış, *S.mutans* 1'in üç farklı antibiyotiğe dirençli olduğu tespit edildiği için bu çalışma için patojen suş olarak belirlenmiştir.

*S.mutans*' ların oluşturdukları biyofilm miktarını tespit etmek için mikrotitrasyon testi uygulanmıştır. *S.mutans* 1' in en yüksek biyofilm oluşturduğu görülmüştür. Bu veriyi desteklemek amacıyla yapılan testte: CRA plakta da koyu siyah renkli kolonilerin oluşması bu bulguyu desteklemiştir.

Bunun yanında probiyotik bakterilerle yapılan mikrotitrasyon testinde ise *L.rhamnosus* 12 sükröz da düşük biyofilm oluştururken, *L.rhamnosus* 15 yüksek biyofilm oluşturmuştur. Probiyotik bakterilerin biyofilm oluşturmaları, patojen bakterilerin yüzeye tutunmasını engellemeleri bu bakteriler ile rekabette önem taşımaktadır (201). *L.rhamnosus* 12' nin *L.rhamnosus* 14' e göre daha düşük biyofilm oluşturması çalışmamızda probiyotik özellikli test bakterisi olarak seçilmesinde belirleyici kriterlerden birisi olmuştur.

Probiyotik bakterilerin antibiyotiğe direnç testinde *L.rhamnosus* suşlarının hepsi gentamisin, amikazin, metronidazol ve vankomisine direnç gösterirken *L.rhamnosus* 14 suşu ek olarak penisiline de dirençli olduğu görülmüştür (Tablo 4.5). Taheur ve ark (202) *P.pentosaceus* suşları ile *L.brevis* 'in peniciline, kanamisine ve streptomisine dirençli olduğunu saptamışlardır. Benzer olarak yapılan çalışmalarda da laktik asit bakterilerinin çeşitli antibiyotiklere dirençli olduğunu ve bakteri seçimindeki kriterlerden biri olduğunu bildirmişlerdir (203-206).

Probiyotik bakterilerin hemolitik aktivite göstermemesi, dolayısı ile patojen olmaması sağlık açısından önem taşıyan bir özelliğidir (202). *L.rhamnosus* izolatlarının hiçbiri hemolitik aktivite göstermemiştir. Buna karşılık patojen *S.mutans* suşları hemolitik aktivite göstermişlerdir.

Samot ve Badet (207) altmış altı oral laktik asit bakterisinin hepsinin *S.mutans*' ı inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Bu konuda yapılan diğer çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir (151, 208-211). Laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal etkisinin laktik asit, hidrojen peroksit, asetik asit, hidrojen sülfür, bakteriyosin ya da bakteriyosin benzeri

maddelerden meydana geldiği bildirilmiştir (212, 213). Restoratif materyallerin üzerinde biyofilm oluşması üzerine probiyotiklerin etkisinin incelendiği çalışmalar az sayıdadır. Çalışmamızda yapılan testler sonucu patojen bakteri olarak restoratif materyallerde *S.mutans* 1' in biyofilm oluşturması ve antibiyofilm olarak probiyotik bakterilerden *L.rhamnosus* 12 kullanılmasına karar verilmiştir. Ve bunun yanında testlerin sükröz içeren ortamda yapılmasının en uygun olacağı tespit edilmiştir. Çalışmamızda kullanılan oral laktik asit bakterileri *Streptococcus* spp. (Tablo 4.6) izolatlarına karşı değişen oranlarda antibakteriyal aktivite göstermiştir.

Çalışmamızda kullanılan hidroksiapatit, farklı restoratif kompozit rezin ve farklı yapıdaki CAD/CAM blok restoratif materyallerinin üzerinde *S.mutans* 1' in biyofilm oluşturması damlatma plak yöntemi ile canlı bakteri sayısının belirlenmesi, spektrofotometrik ölçümler ve SEM görüntüleri üzerinden analizler ile yapılmıştır.

SEM ile morfolojik görüntülerinin incelenmesinde *S.mutans* 1'in test edilen bütün restoratif materyallerde yüzeyini kapladığı görülmüştür. Bu yapının çok katlı yapıya sahip olduğu izlenmiştir. Quiryne ve Bolen (214) tarafından, bu tip görüntülerin biyofilm oluşumu olduğu bildirilmiştir. Benzer olarak yapılan çalışmalarda da *S.mutans*'ın elde edilen tek katlı tabaka şeklinde restoratif materyalleri kapladığı gösterilmiştir (215).

Spektrofotometrik ölçümüne göre en yüksek biyofilm oluşumu G-ænial` da, en düşük biyofilm oluşumu ise Equia Forte`de olmuştur. Ancak bakteri sayımlarına bakıldığında Equia Forte grubunda en yüksek değerde tespit edilmiştir. Equia Forte grubunda spektrofotometrik incelemede kristal viyole ile boyanan disklerde yüksek oranda boya kaldığı görülmüştür. Glasiyel asetik asitle yıkama işlemi sırasında boyanın materyale adsorbe olmasına bağlı olarak biyofilmin tamamının kaldırılamadığı ve bu nedenle spektrofotometrik değerlendirmede biyofilm oluşumunun düşük olarak ölçüldüğünü düşünmekteyiz. Bakteri sayımında en yüksek canlı bakteri sayısı tespit edilmesi bu düşüncemizi desteklemektedir.

*L.rhamnosus* 12 ise Emax, Lava ve hidroksiapatitte biyofilm oluşumu diğer restoratif materyallere göre anlamlı şekilde düşük oluşturmuştur. Ancak bütün örneklerde *L.rhamnosus* 12' nin oluşturduğu biyofilm miktarı *S.mutans* 1'in oluşturduğu biyofilm miktarından çok düşüktür. Bakteri sayımlarına baktığımız zaman ise spektrofotometrik ölçümlerde elde edilen sonuçlardan farklı değerler elde edilmiştir. Biyofilmdeki *S.mutans* 1 sayıları hidroksiapatitte, Beautiful II ve G-ænial`da yüksek olmuştur. Ancak Emax ve Lava`da bakteri sayımları ile spektrofotometrik değerler birbirleri ile uyumlu olarak bulunmuştur. Biyofilm oluşumu materyallerin tipine bağlı olarak değişmiştir. İstatistiksel

olarak da restoratif materyallerde *S.mutans* 1'in biyofilm oluşturması açısından restoratif materyaller arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur ( $p>0.05$ ). Benzer bulgular Hansel ve ark. (216) tarafından da bildirilmiştir. Araştırcılar biyofilm oluşumunun restoratif materyallerdeki doldurucu partiküllerin büyüklüğü ile ilişkili olabileceğini bildirmişlerdir. Bu durumun yüzey morfolojisi açısından önemli olduğunu vurgulamışlardır.

Equia Forte, Beautiful II ve G-ænial' da oluşan biyofilm normal diş dokusuna uyan hidroksiapatitten yüksek olmuştur. Cam iyonomer simanı olan Equia Forte ile nano hibrit kompozit olan Beautiful II, flor salınan restoratif materyallerdir. Her iki materyallerde de bakteri sayımları yüksek olarak bulunmuştur. Materyaller tarafından salınan florun inhibe edici etkisi görülmemiştir. Benzer çalışmalarda cam iyonomer simanlarda florun biyofilm üzerine inhibe edici etkisi olmadığı farklı araştırcılar tarafından bildirilmiştir (10, 217, 218). Hatibovic-Kofman ve Koch (217) tarafından yapılan bir yıllık çalışmanın sonucunda yapılan 6 cam iyonomer restorasyonlarından sadece birinde 10 kat daha fazla flor bulunduğu ancak antimikrobiyal etki için yeterli olmadığı bildirilmiştir. Araştırcılar flor salınımının yararının dişin demineralizasyonu önlemekle sınırlı olduğu bildirmişlerdir. Al-Naimi ve ark. (218) tarafından yapılan invitro bir çalışmada flor içeren cam iyonomer simanların tükürük içinde kompozit yüzeydeki bakteri miktarını ve biyofilm oluşumunu azaltmadığı bildirilmiştir. Araştırcılar, bunun sebebinin florürün etkin bir faktör olmadığı ya da etkili olması için konsantrasyonu çok düşük olduğu belirtmişlerdir. Montanaro ve ark. (122) rezin ile modifiye cam iyonomer materyallerde bakteriyal adezyonda önemli bir azalma olmadığını bildirmişlerdir. Araştırcılar bunun nedeninin 4 saat gibi kısa zaman olabileceğini bildirmişlerdir. Bizim alışmamızda ise 24 saat temas süresi olmasına karşın biyofilm oluşumunda bir azalma olmamıştir. Direk olarak örneğe temas eden yüzeydeki bakteriler bu salınımdan etkilenmemiş görülmektedir. Auschill ve ark. (10) ise in vivo bir çalışmada cam iyonomerde flor salınımına rağmen düşük canlılıkta ince bir biyofilm oluşabildiğini bildirmişlerdir. Ancak her antibakteriyal aktiviteye sahip maddenin, adezyonu önleyici materyal olmayabileceği bildirilmiştir (10). Bu bulguların aksine rezin modifiye cam iyonomerlerle yapılan agar testlerinde 48-72 saat sonra bakteriyel gelişimini azalttığı bildirilmiştir (219, 220). Randall ve Wilson (221) cam iyonomer simanlarının önemli ölçüde flor serbest bıraktığını bildirmiştir. *S.mutans* (222) ve *S.sanguis* (206), cam iyonomerlerden salınan flordan etkilenmiştir. Nicholson ve ark. (224) ortama salınan florun bakteri tarafından üretilen asidi nötralize etmek için tampon görevi yapabileceğini bildirmişlerdir. Bu durum çürük gelişimini de önlemektedir (225) Kompozitlerden daha

kararlı bir yapıya sahip olan cam iyonomerlerin mikrosızıntıyı azalttığından flor salımı ile oral biyofilm oluşumu üzerine etkili olduğu bildirilmiştir (226).

Çalışmamızda kullanılan G-ænial, Clearfil majesty ES 2 , Ælite all purpose body ve Sonic fill 2 kompozit rezin materyallerde hem spektrofotometrik okumalarda hem de bakteri sayımlarında birbirine uyumlu veriler elde edilmiştir. Ve bu materyallerin hepsinde *S.mutans* 1 yüksek biyofilm oluşturmuştur. Yapılan çalışmalarda kompozit rezinlerde, diğer restoratif materyaller ile karşılaştırıldığında daha fazla dental plak oluştuğu bildirilmiştir (227, 228, 229). Resin kompozitlerde polimerizasyonun miktarının düşük oranda olduğu belirtilmiştir (230). Polimerize olmamış monomerlerin salınabileceği ve bu durumun karyojenik bakterilerin gelişmesini hızlandırabileceği vurgulanmıştır (216). Ayrıca polimerize olmuş kompozit rezinlerin in vitroda *S.mutans* gelişimini hızlandırdığı gösterilmiştir (231). Polimerize olmamış monomerlerin büyük çoğunluğunun restorasyonun yaşlanma periyodu boyunca salındığı varsayıldığında, bakteri gelişiminin yalnızca artık monomerlere bağlanması ile açıklanamayacağı rapor edilmiştir (11). Bunun yanında uzun dönemde, resin kompozit restorasyonların yapısı ağız içi koşulları, fiziksel ve kimyasal özellikleri nedeniyle bozulmaktadır. Bunun başlıca nedeninin yüzeydeki mikroorganizma ve yapışmanın yanı sıra biyofilm oluşumu olduğu ve bunun sonucunda da sekonder çürükler ortaya çıktığı bildirilmiştir (232).

Kompozitlerin uzun dönem başarısı için hekimlerin uygulayacağı prosedürlerin yanında materyallerin farklı fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerinin de önemli rolü vardır. Bu özellikler ayrıca organizmaların biyofilm oluşturması için yüzeye bağlanmasını etkileyen faktörlerdir. Dolayısıyla altın, amalgam, seramik, resin kompozit, kompomer ve cam iyonomer simanlar gibi çeşitli dental restoratif materyaller üzerinde gelişen dental biyofilmlerin analizi ve karşılaştırılması yapılmıştır. Materyallerin birçok özelliği yüzey özelliklerini belirlemekte bu da az ya da çok bakterinin yüzey kolonizasyonunun miktarını belirlemektedir (233).

Materyaller düşük adherent özelliğe sahip olursa biyofilm oluşumu azalmakta yada yavaşlamaktadır. Bu durum ise oral plak oluşumunu etkilemektedir. Restoratif materyallerin yüzeyinin fiziko kimyasal özellikleri ilk kolonizasyonun başlamasını belirlemektedir. Bakteriyel adezyonun pasif ve aktif mekanizması alttaki yapıya bağlı olarak değişmektedir (127). Bakteri adezyonunun materyallerin yüzey yapıların yanında yüzey pürüzlülüğü ile de ilgili olduğu araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (10, 121, 122, 125). Oral bakteriler restoratif materyallere farklı mekanizmaların etkisi ile tutunmaktadırlar. Bu tutunma tükürük proteinlerindeki reseptörler aracılığı ile artmaktadır



(135). Bakteri reseptörleri, fimbria ve adezinler aracılığı ile oral yüzeye tutunmaktadır. Hücre dışı salgılar bu tutunmayı artırmaktadır. Bu proteinler restoratif materyallerin yüzeyini kaplayarak bakteriyal adsorbsiyonda önemli bir rol oynamaktadır. Streptokoklar pelikül üzerine ilk tutulan bakteriler olup, asidik prolinden zengin proteinlere, alfa amilaz ve sialik asit gibi reseptörlere bağlanmaktadır. Streptokokların pelikül yüzeyde tutunmasını takiben diğer bakteriler bu bölgeye yerleşmeye başlar. Biyofilm içindeki bakteri sayısı test edilen materyallerin tiplerine bağlı olarak değişmektedir ve bu materyallerdeki dolducu partikül büyüklüğü ile ilişkide olabilmektedir (216). Yüzey morfolojisinin önemli olduğuna dikkat çekilmiştir (234, 154). Hansel ve ark. (216) tarafından yapılan bir çalışmada nanohibrit olan Tetric Evoceram`da, rezin modifiye cam iyonomer simanlara göre *S.sobrinus`un daha fazla bulunduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar, biriken bakteri miktarının test materyallerinin tipine bağlı olduğunu rapor etmişlerdir. Yine bu durumun doldurucu partiküllerinin büyüklüğüne de bağlı olabileceği belirtilmiştir (234) Ayrıca yüzey morfolojinin önemine de işaret edilmiştir (154, 235). Çalışmamızda, hidroksiapatit ve restoratif materyallerden hazırlanan örneklerin Ra değerleri materyale göre değişiklik göstermiştir. Biyofilmin spektrofotometrik değerlendirilmesinde en düşük biyofilm değeri Equia Forte materyalinden elde edilmiştir. Equia Forte`nin Ra değeri, hidroksiapatitin Ra değerinden sonra en yüksek pürüzlülük değeridir. Elde edilen bu Ra değeri bir çok araştırmacının da bildirdiği gibi artan pürüzlülük ile biyofilm oranı artışını desteklemektedir (121,10). Bunun yanında bakteri sayımları açısından bakıldığında Equia Forte`de yüksek bakteri sayımı elde edilmiştir.*

Çalışmamızda en düşük Ra değeri Emax ve Lava`da elde edilmiştir. Bu materyallerde *S.mutans 1`in oluşturduğu biyofilm miktarı ve biyofilmdeki bakteri sayıları da düşük bulunmuştur. Buna karşın G-aenial, Aelite all purpose body, Sonic fill 2 ve Clearfil majesty ES 2 S.mutans 1`in oluşturduğu biyofilm miktarı ve biyofilmdeki bakteri sayıları yüksek olarak belirlenmesine karşılık Ra değerleri sırasıyla 0,034±0,014, 0,038±0,015, 0,090±0,016, 0,052±0,011, olarak bulunmuştur. Bu Ra değerlerine baktığımızda hidroksiapatitin Ra değerinin altında olmalarına karşılık oluşan biyofilm miktarları daha yüksektir. Çalışmamızda hidroksiapatitte en yüksek biyofilm oluşumu *S.mutans 1 ve L.rhamnosus 12`nin birlikte uygulandığı çalışmada görülürken en yüksek Ra değeri L.rhamnosus 12`nin tek başına uygulandığı çalışmada bulunmuştur. SEM görüntülerinde S.mutans 1 ve L.rhamnosus 12`nin birlikte uygulandığı çalışmada üç boyutlu biyofilm izlenmiştir. Diğer görüntülerde böyle bir biyofilm oluşumu gözlenmemiştir.**

Beautiful II 'de *S.mutans* 1 ve *L.rhamnosus* 12'nin birlikte uyguladığımız örneklerin işlem sonrası ölçülen Ra değeri artmıştır. Bu uygulamada biyofilm miktarı *S.mutans* 1'in tek başına uyguladığından daha düşüktür. Bu durum SEM görüntüleri ile de paralellik göstermiştir.

Clearfil Majesty ES 2'de ise en yüksek Ra değeri (0,100 ±0,007) *L.rhamnosus* 12' nin tek başına uygulandığı çalışmada ölçülürken, en yüksek biyofilm tek başına *S.mutans* 1'in ve *S.mutans* 1 ve *L.rhamnosus* 12'nin birlikte uygulandığı çalışmada olmuştur. SEM görüntüleri de bu bulgulara paralellik göstermiştir.

Sonic fill 2'de en yüksek Ra değeri *S.mutans* 1 ve *L.rhamnosus* 12'nin birlikte uygulandığı (0,159 ±0,160) ve filtre içinde uygulandığı (0,160 ±0,201) çalışmada ölçülmüştür. Ancak biyofilm miktarına bakılınca en yüksek biyofilm *S.mutans* 1'in tek başına uyguladığında elde edilmiştir. SEM görüntülerinin de bu bulgulara paralel olduğu görülmüştür.

G-aenial'de en yüksek Ra değeri *S.mutans* 1 ve *L.rhamnosus* 12' nin birlikte uygulandığı (0,141 ±0,005) ve filtre içinde uygulandığı (0,123 ±0,004) çalışmada ölçülmüştür. *S.mutans* 1'in tek başına uyguladığında ise Ra daha düşük (0,101 ±0,012 ) olmasına karşın her üç uygulamada da yüksek biyofilm saptanmıştır. SEM görüntüleri de bunu doğrulamıştır.

Ælite all purpose body'de en yüksek biyofilm ve Ra değeri *S.mutans* 1'in tek başına uyguladığında elde edilmiştir. SEM görüntüleri de buna paralellik göstermiştir.

Çalışmamıza benzer olan çalışmalarda da yüzey pürüzlülüğü ile biyofilm arasındaki ilişkide çelişkili görüşler bulunmaktadır. Çalışmamızda Emax ve Lava materyallerinde bakteri uygulaması ile Ra değerleri artış göstermiştir. Ancak en yüksek Ra değeri saptanan uygulama *S.mutans* 1 ve *L.rhamnosus* 12'nin birlikte uygulaması olmasına karşın en yüksek biyofilm oluşumu *S.mutans* 1'in tek başına uygulandığı çalışmada saptanmıştır. Bu durum SEM görüntüleri ile de paralellik göstermiştir. Benzer olarak yapılan çalışmalarda Hahnel ve arkadaşları (9), cam, lityum disilikat cam, cam-infiltrate zirkonya, yarı sinterize zirkonya, sıcak izostatik presleme zirkonya seramik malzemelerinde biyofilm oluşumu üzerine yüzey özelliğini etkisini araştırdıkları çalışmada yüzey pürüzlülüğü ile streptokokkal adezyon arasındaki korelasyonun zayıf olduğunu bildirmişlerdir. Benzer başka bir çalışmada ise seramik ve iki indirekt ve bir direk kompozit materyalde yüzey pürüzlülüğünün materyale göre değiştiğini ve bakteriyel adezyonun materyallere göre değiştiği bildirilmiştir. En düşük adezyonun yüzey pürüzlülüğü düşük olan seramik materyalde olduğunu gözlenmiştir. Araştırmacılar

materyal yüzeyinin kimyasal kompozisyonunun bakteri adezyonu için önemli olduğu bildirmişlerdir (10,134). Bu bulguların aksine Kawai ve ark. (236) porselen materyalde yüzey pürüzlülüğünün bakteri adezyonu üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmalarında en pürüzsüz yüzeyde düşük bakteri adezyonu gözlenirken en pürüzlü olan yüzeyde en yüksek adezyon gözlediklerini bildirmişlerdir. Dezelic ve ark. (123) yüzey pürüzlülüğünün genç biyofilm oluşumu üzerine etkili iken biyofilmin büyümesi ve olgunlaşması sırasında etkili olmadığını bildirmişlerdir.

Restoratif materyallere bakteri uygulaması yapıldıktan sonra Ra değerlerinde tespit ettiğimiz artışa belli oranda gerek sayım için yapılan sonikasyon işlemleri gerekse alkol ve boyama işlemlerinin de etkili olabileceğini düşünmekteyiz. SEM görüntülerinde yüzey pürüzlülüğünün etkisi belirlenmemiştir.

Seramik yüzeyler üzerinde biyofilmlerle ilgili çok az bilgi vardır. Oral hijyen ortamı olmayan koşullarda yapılan seramik inleyelerin yüzeylerinde 3 günlük periyotta doğal dişin yüzeyine göre daha az plak birikmiştir (237).

Auschill ve ark. (10) tarafından yapılan bir çalışmada seramiklerin altın ve amalgamlarla kıyaslanmıştır. Beş günlük periyotta altın ve amalgamlarda 11-17µ kalınlığında biyofilm oluşur iken seramik materyallerin yüzeylerinde 1-6µ kalınlığında biyofilm bulunduğu bildirilmiştir.

Bizim çalışmamızda *S.mutans* 1'in en düşük adezyonu Emax ve Lava'da olmuştur. Benzer bulgular seramikler için Meier ve ark. (238) tarafından da bildirilmiştir. Araştırmacılar materyallerin cam içeriği ile bakteriyel canlılık arasında kolerasyon olduğunu söylemişlerdir. Tetragonal stabilize zirkon, zirkonla güçlendirilmiş cam seramik, cam alümina seramik üzerinde *S.oralis* ve *S.sanguinis* sayısının düşük olduğu belirlenmiştir. Seramiklerin içeriklerinin adezyon sırasında bakteriyel canlılığı etkilediği bildirilmiştir. Kompozit ve cam iyonomerlerde biyofilm oluşumu bu restoratif materyallerin yüzeylerinin pürüzlülüğünün artmasına yol açmaktadır. Yüzey bozuldukça biyofilm oluşumu da artmaktadır. Bunun kompozit restorasyonların çevresinde sekonder çürük oluşumuna neden olduğu bildirilmiştir (11, 18). Beyth ve ark. (11) rezin kompozitlerin yüzeyinde bakterilerin nanometrik yüzey değişimine neden olduğunu bu durumun yüzey pürüzlülüğünü artırdığı ve sonuçta biyofilm oluşumunun arttığını bildirmişlerdir. Resin kompozit ve cam iyonomerlerin yüzeylerinin bozulması, pürüzlülüğün artmış olduğunu, doldurucu partikülleri etkilediğini ve materyallerin mikrosertliğinin azaldığını bildirmişlerdir. Resin

kompozitler üzerine ilave edilen *S.mutans* ile 1 ay bekletildikten sonra doldurucu partikülleri 0.04 ile 0.2 µ arasında olan BisGMA, UDMA içeren rezin kompozit (Heliomolar) yüzey pürüzlülüğünde bir artış göstermişlerdir. Buna karşın biyofilm gelişiminden sonra doldurucu partikülleri 0.01 ile 3.5 µ arasında olan rezin kompozitlerde (Tetric Ceram ve Z250) daha az pürüzlülük meydana geldiği saptanmışlardır.

Rezin kompozitlerin konversiyon derecesinin tamamlanmadığı ve polimerizasyona girmemiş monomerlerin yaklaşık %10'unu suya salındığı bildirilmiştir. Özellikle kompozit rezinlerden salınan etilenglikol dimetilakrilat ve trietilen glikol dimetakrilat *S.mutans* ve Laktobasillus gibi karyogenik bakterilerinin gelişimine neden olabileceği bildirilmiştir (216). *S.sobrinus*'un glikotransferaz aktivitesini artırdığı saptanmıştır (239).

Takahashi ve ark. (234) tarafından yapılan bir çalışmada kompozitteki etilenglikol dimetilakrilat monomerlerin *S.sobrinus* ve *Streptococcus sanguis*'un gelişimini artırdığı spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Ancak bakteri sayımlarına bakıldığında bir artış olmadığı bildirilmiştir. Bu durum bakteri sayısından ziyade bakterinin büyüklüğünün artmasıyla açıklanmıştır. Brambilla ve ark. (233) tarafından yapılan bir çalışmada kompozitlerin ışınlama süresi arttırıldığında monomer salınımının etkisi azaldığı bildirilmiştir. Kompozitlerden salınan monomerlerin hacmi büyüktür ve bu monomerler, tükürük atılımı yada sıvı alımıyla sürekli yenilenirken cilalanan kompozit yüzeyin özellikleri etkilenmektedir (121).

Restoratif materyaller üzerinde biyofilm oluşumu kadar buradaki bakterilerin canlılığı da büyük önem taşımaktadır. Dental plağın patojenitesinin ortaya konması açısından bakteri canlılığı önem taşımaktadır. Çalışmamızda restoratif materyaller üzerinde oluşan biyofilmdeki bakteri sayımları restoratif materyallere bağlı olarak farklı değerlerde olmuştur. En yüksek bakteri sayısı Equia Forte, Beautiful II ve G-ænial materyallerinde  $10^8$  kob/ml olarak bulunurken Emax ve Lava`da ise sırasıyla  $10^5$  kob/ml ve  $10^4$  kob/ml civarında saptanmıştır. Çalışmamızda restoratif materyallere göre değişmekle birlikte bakteri sayısı ile biyofilm oluşumu benzer olarak bulunmuştur. Benzer olarak amalgam restoratif materyaller kullanılarak yapılan bir çalışmada da bakteriyal adezyon ile bakteri sayısı arasında korelasyon bulunduğu saptanmıştır. Ancak amalgamda yüksek bakteri birikimine karşılık canlı bakteri sayısının düşük olduğu bildirilmiştir (135).

Biyofilm oluşumu farklı mekanizmalarla azaltılmaya çalışılmaktadır. Bunlardan biride son yıllarda gündeme gelen probiyotik bakteriler yardımıyla biyofilmin önlenmesi yoludur. Bu şekilde bir taraftan biyofilm gelişimi önlenmeye çalışılırken diğer taraftan sağlığı destekleyecek bir ürünün kullanılması kimyasal maddelere ve ilaç kullanımına tercih edilmeye başlanmıştır. Bu nedenle restoratif materyallerin üzerinde biyofilm oluşumunu önlemek yada azaltmak için oral bir bakteri olan *L.rhamnosus* 12'nin kullanılabilirliği in vitro olarak araştırılmıştır. Çalışmalarda restoratif materyallerden hazırlanan örnekler tükürük ile kaplandıktan sonra kullanılmıştır. Çalışmada iki uygulama gerçekleştirilmiştir. Birinci uygulamada her iki bakteri aynı ortamda bulunurken diğer uygulamada *L.rhamnosus* 12 bir filtre içine konmuştur. Bu şekilde bakteri teması az olacak ancak bakterinin ürettiği maddelerin sürekli olarak ortama geçmesi sağlanmış olacaktır. Ancak filtrenin por çapı 0,4µm olduğu için zaman içinde ürünlerin yanında az da olsa bakteri geçişi olmuştur.

Yapılan çalışmalarda laktik asit bakterilerinin *S.mutans* 1 üzerine inhibitör etki gösterdiği ortaya konmuştur (206, 240). *L.lactis* besi ortamında *S.mutans*'a antogonist etki göstermiştir (240). Kıvanç ve ark (206) test edilen 24 oral laktik asit bakterilerinin farklı oranlarda oral kaviteden izole edilen dört *S.mutans* suşunu besi ortamında inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Simark-Mattsson ve ark. (210) tarafından yapılan çalışmada in vitro ortamda Laktobasil bakterilerin *S.mutans*'ın gelişimini inhibe ettiğini göstermiştir.

Yapılan çalışmaların büyük bir kısmı polistren yada cam yüzeyine adezyonun engellenmesiyle ilgilidir. Restoratif materyallerde LAB'nin *S.mutans* 1'in biyofilm oluşumu üzerine etkisinin araştırıldığı çok az sayıda çalışma bulunmaktadır.

İn vitro çalışmalarda optimum koşullarda biyofilm oluşumu incelenmiştir. Ancak ağız ortamında bulunan lizozim, aglütininler ve musin gibi tükürük proteinlerinin bu invitro koşullarda bulunmamaktadır. Restoratif materyallerde bakteriyel adezyon için uygun koşullar sağlanmıştır.

Hidroksiapatitte *S.mutans* 1'in *L.rhamnosus* 12 ile birlikte uygulandığı işlemde spektrofotometrik değerlendirmede biyofilm miktarı bu mikroorganizmaların tek tek oluşturdukları biyofilm miktarından çok daha yüksek olarak bulunmuştur. *L.rhamnosus* 12'nin filtre içine uygulandığı işlemde ise biyofilm miktarının daha düşük olduğu görülmüştür. *L.rhamnosus* 12 hidroksiapatit üzerinde tek başına biyofilm oluşturamamıştır. Bakteri sayımlarına baktığımızda ise *S.mutans* 1 ile *L.rhamnosus* 12'nin birlikte uygulandığı işlemlerde *L.rhamnosus* 12'nin sayısı yüksek iken (log<sub>10</sub> 6,738 kob/mL) *S.mutans* 1 sayısı (birlikte uygulamada 4,889 Log<sub>10</sub> kob/mL ve filtre

uygulamasında 3,874 Log<sub>10</sub> kob/mL) önemli ölçüde azalmıştır. *S.mutans* 1, *L.rhamnosus* 12' nin biyofilm oluşumunu teşvik etmiştir. Kumada ve ark. (241) *Lactobacillus casei* ve *Lactobacillus salivarius*'un *S.mutans* ile birlikte oldukları kültürlerde biyofilm oluşumunu engellenmediğini bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda da *L.rhamnosus* 12 ile *S.mutans* 1'in birlikte uygulandığında yüksek biyofilm oluştuğu görülmüştür. SEM görüntülerinde de yüksek biyofilm oluşumu gözlenmektedir. Benzer bulgular Filoche ve ark (242) tarafından da bildirilmiştir. Araştırmacılar *L.rhamnosus* ve *Lactobacillus plantarum*'un biyofilm oluşumunun Actinomyces türleri ve *S.mutans* tarafından stimule edildiğini açıklamışlardır. Çalışmamızda *S.mutans* 1 ve *L.rhamnosus* 12 tek başlarına yüksek biyofilm oluşturamazken birarada olduklarında yüksek biyofilm oluşturmuşlardır. Ancak hidroksiapatit üzerinde kokültürdeki *S.mutans* 1 sayısı tek kültürdeki *S.mutans* 1 sayısından daha düşüktür. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı olarak bulunmuştur (p<0.05). *L.rhamnosus* 12, *S.mutans* 1 sayısını etkilemiş ancak kendisi daha fazla gelişmiştir. *S.mutans* 1 sayısının azalması muhtemelen *L.rhamnosus* 12'nin antimikrobiyal madde salgılamasıyla ilişkili olabilir. Filtre içine *L.rhamnosus* 12 ilavesinde ise yine *L.rhamnosus* 12 sayısı artmıştır. Ancak bu işlemde *L.rhamnosus* 12'nin antibakteriyel maddeleri daha fazla filtreden geçtiği için daha etkin görülmektedir. Ancak filtre altına geçen *L.rhamnosus* 12'nin gelişmesi yine stimule edilmiştir. İn vitro çalışmalarda tükürük kaplı hidroksiapatitte *S.mutans*'ın adezyonunu probiyotiklerin engellediği bildirilmiştir (175). Bizim çalışmamızda tükürük kaplı hidroksiapatitte benzer veriler elde edilmiştir.

Uygulamaların son pH' sına bakıldığında pH'nın 4 civarında değiştiği görülmüştür. Dental biyofilmde bakterilerin yaşamını sürdürmesi için üretilen laktik asidi tolere etmek veya kullanmak önem taşımaktadır (243).

Çalışmamızda *S.mutans* 1'in biyofilm oluşumu bütün restoratif materyallerde değişen oranlarda *L.rhamnosus* 12 tarafından engellenmiştir. Beautiful II, Sonic fill 2, Emax ve Lava` da bu inhibisyon yüksek olmuştur.

*L.rhamnosus* 12 ve *S.mutans* 1' in birlikte kullanıldığı kültürlerden filtre içine uygulanan *L.rhamnosus* 12, Beautiful II, Sonic fill 2, Emax ve Lava restoratif materyallerinde daha etkili olmuştur. Bu restoratif materyallerde bakteri sayımları da benzer özellik göstermiştir.

Benzer olarak yapılan bir çalışmada laboratuvar ortamında *Lactobacillus reuteri* SD2112 ve *L.rhamnosus* GG ve *S.mutans*'ın biyofilm oluşumunu engellediği bildirilmiştir (244).

Hayvan deneylerinde %5 sükrözün diyetinde bulunması çürük oluşumu için yeterli olduğu saptanmıştır (245). İn vivo`da suda çözünmeyen glukanların azalması plak oluşumunu azalttığı ve buna bağlı çürük oluşumunun azaldığı saptanmıştır (246, 247). Glukosiltransferaz (GTFs)'ın bozulması insanlarda da çürüğün azalmasına neden olup olmayacağı belirsiz olduğu vurgulanmıştır (248). Sükrözün varlığında *S.mutans* 1'in biyofilm oluşturması suda çözünebilir glukanlar ile ilişkili bulunmuştur ( 248). Chung ve ark (249) 150 laktobasil izolatından 2 sinin *S.mutans*'in çözünmez glukan üretimini inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Bunlardan birinin *L.fermentum* olarak tanımlandığını glukan oluşumunu %91 oranında inhibe ettiğini saptamışlardır. *S.mutans* sayısında da önemli oranda düşme olduğunu saptamışlardır. *S.mutans*' in biyofilm oluşumunun çözünmez glukan üretiminin engellenmesi ile önlenebileceğini bildirmişlerdir. *L.fermantum*'un suda çözünebilir ekstraktının *S.mutans*'ı tamamen inhibe ettiği saptanmıştır (250).

Fitre içine uygulanan *L.rhamnosus*' un biyofilm üzerine etkili olması kültür süpernatantında biyofilm üzerine etkili olduğunu göstermiştir. Bu uygulamada *S.mutans* 1 sayısı önemli ölçüde azalmıştır. Soderling ve ark. (244)' de yaptıkları çalışmada *L.rhamnosus* GG ve *L.plantarum* 'un süpernatantlarının *S.mutans* üzerine etkili olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar biyofilmde laktik asit bakteri sayımının yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Ancak bizim bulgularımız da birçok restoratif materyalde laktik asit bakteri sayımı daha düşük olarak bulunmuştur.

İN vitro çalışmalarda probiyotik laktik asit bakterisi ve *S.mutans* arasındaki koagregasyon klinik çalışmalarda *S.mutans*'in azalmasını kısmen açıklamaktadır ( 252, 251).

Söderlin ve ark. (244) ise *S.mutans* 1 sayısındaki azalmanın pH ile ilişkili olduğunu vurgulamışlardır. Bizim çalışmamızda ise azalmanın pH'ya bağlı olmadığını düşünüyoruz. Hidroksiapatitte son pH'larla baktığımızda birlikteki kültürlerde 4.20-4.35 arasında değişmiştir ki bu pH, *S.mutans* 1'in tek başına geliştiği değere yakındır. Beautiful II' de *S.mutans* 1 uygulamasında pH 4,08 iken *L.rhamnosus* 12 ile birlikte uygulamada pH 3,94, filtreli uygulamada ise pH 4,00 olarak belirlenmiştir. Sonic fill 2' de ise *S. Mutans* 1 uygulamasında pH 3,88 iken *L.rhamnosus* 12 ile birlikte uygulamada ve filtreli uygulamada pH sırasıyla 3,91 ve 3,89 olarak ölçülmüştür. Emax' ta *S.mutans* 1 uygulamasında pH 4,15 iken *L.rhamnosus* 12 ile birlikte uygulamada pH 4,01, filtreli uygulamada ise pH 4,23 olarak belirlenmiştir. Lava' da ise *S.mutans* 1 uygulamasında pH 4,11 iken *L.rhamnosus* 12 ile birlikte uygulamada ve filtreli

uygulamada pH sırasıyla 4,04 ve 4,14 olarak saptanmıştır. Bu değerlere bakıldığında biyofilm oluşumunun azalmasında pH'nin etkin olamayacağını düşündürmektedir. Çünkü benzer pH'da tek başına uygulanan *S.mutans* 1'in yüksek biyofilm oluşturduğu görülmektedir.

Ahmed ve ark. (199) 3 laktobasil suşunun biyofilm oluşumunu azalttığını bildirmişlerdir. Ancak mekanizmayı tam olarak belirleyemediklerini, bu etkinin muhtemelen antibakteriyel peptid üretimi, besin maddelerine rekabet ve adezyon yüzünden olabileceğini bildirmişlerdir. Glukosiltransferaz enzimlerinin dental plak oluşumuna neden olan çözünmez glukon polimerindeki  $\alpha$  (1-3) veya  $\alpha$  (1-6) bağlarından sorumlu olduğu bildirilmiştir (253). *L.acidophilus*'un varlığında glukosiltransferaz enzimlerinin ekspirasyonunun önemli ölçüde azaldığı belirlenmiştir (199). Glukosiltransferaz enzimleri virulans faktör olarak kabul edilmektedir ve dental çürüğün önlenmesi için bu enzimin azaltılması gerektiği kabul edilmektedir. Glukosiltransferaz enzimlerinin azalması ile çözünmez glukon daha az birikmektedir. Tahmourespour ve ark (254) tarafından yapılan bir çalışmada da *L.acidophilus*'un *S.mutans* biyofilmini azalttığı bildirilmiştir.

Equia Forte restoratif materyalinde birlikte ekilen kültürlerde *L.rhamnosus* 12'nin filtre içine konulduğu uygulamaya göre yüksek olmakla birlikte her iki uygulamada da *S.mutans* 1 biyofilm oluşumu üzerine etkili olduğu görülmüştür. *S.mutans* 1 tek başına uygulandığında örnek üzerindeki bakteri sayısı  $8,38 \pm 0,19 \log_{10}/\text{mL}$  iken *S.mutans* 1 ve *L.rhamnosus* 12 birlikte uygulandığında *S.mutans* 1 sayısı  $7,08 \pm 0,50 \log_{10}/\text{mL}$ , filtre içinde uygulandığında ise *S.mutans* 1 sayısı  $3,69 \pm 0,77 \log_{10}/\text{mL}$  olarak belirlenmiştir. Tek kültür olarak uygulanan *S.mutans*'ta pH 4.18 iken 2 kültürün bir arada olduğu işlemlerde pH 4.15- 4.16 arasında değişmiştir. *L.rhamnosus* 12'nin tek kültür olması durumunda da pH 5.0 olarak saptanmıştır. Benzer bulgular Beautiful II'de elde edilmiştir. Ancak Beautiful II'de *L.rhamnosus* 12'nin inhibe edici etkisi her iki uygulamada da yüksek olmuştur. pH değerlerine bakıldığında tek başına ekilen *S.mutans* kültürünün son pH'sı 4.08 iken birlikte kültürlerde 3.95 ile 4.23 arasında değişmiştir. Flor salınan bu iki restoratif materyallerde florun bir etkisi saptanamamıştır. Araştırmacılar flor salınımının pH'yı nötralize edebileceğini bildirmiştir. Ancak bulgularımızda bunu da net bir şekilde gözleyemedik.

Kompozit restoratif materyal olan G-aenial, Aelite all purpose body ve Clearfil Majesty ES 2'de yine *L.rhamnosus* 12, *S.mutans* 1'in biyofilm oluşumunu her iki uygulamada belli oranda azaltmıştır. Bu restoratif materyallerdeki etkinin de pH ile



ilişkili olmadığını düşünmekteyiz. *L.rhamnosus* 12' nin *S.mutans* 1 üzerine inhibisyon etkisi olduğu saptanmıştır. Bu inhibisyon etkisi çeşitli restoratif materyallerde biyofilm oluşumunu engellemesiyle de görülmüştür. Bu inhibisyon etkinin pH'ya bağlı olmadığını, büyük ihtimalle sahip olduğu antibakteriyel peptidler nedeniyle olduğunu ve koagregasyonla ilişkili olduğunu tahmin ediyoruz. Benzer bulgular Lee ve Kim (203) tarafından da bildirilmiştir. Araştırmacılar *L.acidophilus*, *Lactobacillus casei* ve *L.rhamnosus*'un biyofilm oluşumunu azalttığını bildirmişlerdir. En etkili probiyotik bakterinin ise *L.rhamnosus* olduğunu bildirmişlerdir. Ancak bizim bulgularımızla elde ettiğimiz gibi Lee ve Kim (203)'de bunun sadece antibakteriyel aktivite ile açıklanamayacağını bildirmişlerdir. *L.rhamnosus*'un etkisinin Haukioja ve ark (175) bildirdiği gibi saliva kaplı restoratif materyalde tükürük pelikülün protein kompozisyonunu modifiye ederek diğer bakterilerin adezyonunu engellemiş olabileceğini düşünmekteyiz.

Çalışmanın sonuçlarına bakıldığında *S.mutans* 1' nin restoratif materyaller üzerinde biyofilm oluşumu *L.rhamnosus* 12 tarafından önemli ölçüde engellenmiştir. Bu durum SEM görüntüleri ile de doğrulanmıştır. Büyük ihtimalle *L.rhamnosus* 12 biyofilm oluşumunu engellemek için bazı substratlar üretmektedir. Çünkü *L.rhamnosus* 12'nin filtre içine uygulanması ile ortamdaki bakteri sayısı azaltılınca biyofilm oluşumu önemli ölçüde azalmıştır. Bu durum canlı bakteri sayımında da kendini göstermiştir. *S.mutans* 1 sayımı bu uygulamada önemli ölçüde azalmıştır. Özellikle Sonic fill 2, Bisco, Emax ve Lava' da bu durum açıkça görülmektedir. Tabii burada restoratif materyalin yapısı ve yüzey özellikleri de büyük önem taşımaktadır. *L.rhamnosus* sınıf II a pediosin tip bakteriyosin üretmektedir (255).

Çalışmamızda kullandığımız *L.rhamnosus* 12 bakteriyosin yada bakteriyosin benzeri peptit üretmektedir. Bu peptidler Gram pozitif bakterilerin biyofilm oluşumu ve gelişimi üzerine inhibitör etki yapmaktadır. Daha sonra yapılacak çalışmalarla bu durum ortaya konabilir. Benzer olarak elde edilen çalışmalarda da aynı veriler elde edilmiştir (256). İn vitro olarak yapılan bir çalışmada probiyotik laktik asit bakterilerinin *S.mutans* 'ın adezyonunu engellediğini, bunun muhtemelen probiyotik bakterinin tükürük pelikülünün protein kompozisyonunu modifiye etmesi nedeniyle adezyonun önlenmiş olacağı bildirilmiştir (175).

Oral biyofilm EPS, protein, bakteriyel DNA ve bakteri artıklarından oluşmaktadır. Bu yapı biyofilm içine antibiyotiklerin girmesini engelleyen bir fiziksel bariyer görevi görmektedir. (16, 257).

*S.mutans*, sükröz içeren besiyerinde yüksek miktarda EPS içeren bir biyofilm oluşturur (258, 197). *S.mutans* 1'in glukan üretimi *L.rhamnosus* 12'nin varlığında değişmiş olabilir. Ve bu ortamda gelişmeyebilir. Benzer bulgular Lee ve Kim (203) tarafından bildirilmiştir. *L.acidophilus*, *L.casei* ve *L.rhamnosus*'un *S.mutans* gelişmesini engellediğini bildirmişlerdir. Lee ve Kim (203) bunların içinde *L.rhamnosus*'un *S.mutans*'ın biyofilm oluşmasını engelleyen en etkili probiyotik olduğunu rapor etmişlerdir. Araştırmacılar bu tip kültür ortamlarında biofilm bağlanma kuvvetini arttıran glukanın sentezinin azaldığını saptamışlardır (86). Yapılan çalışmalar oral biyofilm oluşumunu engellenmesinin, çürük oluşumunun önlenmesinde önem taşıdığını bildirmektedirler (16, 196, 197).

Kompozit rezinlerden salınan bazı monomerler, *S.mutans* ve *L.rhamnosus*' un gelişmesinde artışa neden olabilir. Benzer olarak yapılan bir çalışmada kompozit rezinlerden salınan monomerlerin *Streptococcus sobrinus* ve *Lactobacillus acidophilus*'un gelişimini stimule ettiği bildirilmiştir (228). Kompozit rezinlerin dönüşüm derecesi hiçbir zaman tamamlanmamıştır ve yaklaşık % 5 ila % 10 polimerize monomer su içinde ekstrakte edilebilir. Kompozitlerde özellikle etilen glikol dimetilakrilat ve trietilenglikol dimetakrilat salınımının mutans streptokoklar gibi karyojenik bakterilerin gelişimini arttırmak ve laktobasil organizmalar çoğunlukla kompozit dolguların kenarlarında gelişebileceği (216) ve *S.sobrinus*'ta (239) glukosiltransferaz aktivitesini arttırdığı bildirilmiştir. Trietilenglikol dimetakrilatın eter kısmı olarak, trietilenglikolün, biyofilm oluşumu içinde yer alan glukosiltransferaz B'nin sentezlenme seviyelerini ve *S.mutans*'ta varsayılan bir kopyalayıcı regülatör gen olarak yfiV'yi modüle ettiğini bulmuşlardır (259).

Kompozit rezinlerin yüzeyinde gelişen *S.mutans* biyofilmlerinin, yüzey mikro sertliğini etkilemeden yüzey pürüzlülüğünü arttırdığı, fakat yüzey bütünlüğündeki değişimin, biyofilmin daha fazla birikmesine neden olabileceği de bildirilmiştir (11,261,262). *S.mutans*'ın yapay substratlarda kolonize olma yeteneği, dental materyal yüzey biyodegradasyonu ve ikincil çürüklerin restorasyonun değiştirilmesinin ana sebebi olan gelişimine yol açabilir (260, 263-267).

Derchi ve ark. (268) tarafından yapılan çalışmada indirekt kompozitler direk kompozitlere göre daha az biyofilm oluşumu olduğu bildirilmiştir. Kompozitlerin yüzeyinde meydana gelen derin çukurcuklar, bakteri kolonizasyonu için uygun yerler olup diş fırçalama ile kolaylıkla uzaklaştırılmamaktadır. Bu da biyofilm oluşumu

üzerine yüzey pürüzlülüğü ve topografyasının etkisi ile açıklanabilir. Test örneklerinden Beautifull II, G-aenial , Clearfil majesty ES 2, Aelite all purpose body ve Sonic fill 2 yüksek *S.mutans* 1 ve *L.rhamnosus* 12 birikimi bunların yüzey özellikleriyle açıklanabilir.

Çalışmamızda oral *L.rhamnosus* 12`nin çeşitli restoratif materyallerde *S.mutans* biyofilm oluşumunu engelleyip engellemediği; ya da biyofilm oluşumunu azaltıp azaltılmadığı in vitro koşullarda incelenmiştir. Bugüne kadar yapılan çalışmalara bakıldığında genellikle standart bakterilerin kullanıldığı görülmektedir. Çalışmamızda, ülkemizdeki kişilerden izole edilen oral bakteriler kullanılmıştır. Gerek patojen bakteriler gerek laktik asit bakterisi öncelikle test edilerek en uygun kültürlerin seçilmesine özen gösterilmiştir. Ülkemizden izolatların test edilmesi bu laktik asit bakterisinin standart bakterilerine göre daha yararlı olabilir. Probiyotik özellik suşa özgü bir özellik olduğu için en etkili olanın belirlenmesi yararlı olacaktır. Literatür taramasında restoratif materyallerde oluşan biyofilm üzerine laktik asit bakterilerinin etkisi ile ilgili bir çalışmaya rastlamadık. Çalışmaların büyük çoğunluğu hidroksiapatit üzerinde yada mikrotitrasyon plaklarında yapılmıştır. Laktik asit bakteri çalışmaları ise sadece *S.mutans* sayısının çeşitli gıdalar ile azalıp azalmadığı ile ilgili çalışmalardır. Bu nedenle bizim çalışmamız restoratif materyallerde biyofilm oluşmasına laktik asit bakterilerinin etkisini gösteren ilk çalışmalardan biridir.

Ancak bu çalışmada biz oluşmuş bir biyofilm üzerine etkisini araştırmadık. Daha sonra yapılacak çalışmalarda araştırılması faydalı bilgiler verebilir. Bu veriler restoratif materyal üreticilerine yararlı bilgiler verebilir. Bu konuda yeni materyal üretiminde bu hususun göz ardı edilmemesi gerektiği ortaya çıkmaktadır.

Çalışmamızda belli bir etki gördüğümüz *L.rhamnosus* 12`nin in vivo olarak denenmesi ve doğal ağız ortamında davranışının incelenmesi yararlı olacaktır.

## 6-SONUÇLAR

1) Çalışmamızda yapılan testler sonucu patojen bakteri olarak restoratif materyallerde en yüksek biyofilmi oluşturan *S. mutans* 1 ve antibiyofilm olarak probiyotik bakterilerden *L.rhamnosus* 12 tespit edilmiştir.

2) Biyofilm oluşumunun izlenmesinde canlı bakteri sayımı önem taşımaktadır. Her materyal için mikrotitrasyon yöntemi her zaman doğru sonucu vermeyebilir. Bunun mutlaka doğrulanması gerekmektedir.

3) Bakteri sayımlarına baktığımız zaman ise spektrofotometrik ölçümlerde elde edilen sonuçlardan farklı değerler elde edilmiştir. Biyofilm oluşumu materyallerin tipine bağlı olarak değişmiştir.

4) *S.mutans* 1 test edilen restoratif materyallere göre farklı oranlarda biyofilm oluşturmuştur.

5) SEM ile morfolojik görüntülerinin incelenmesinde *S.mutans* 1'in test edilen bütün restoratif materyallerde yüzeyini kapladığı görülmüştür. Bu yapının çok katlı yapıya sahip olduğu izlenmiştir.

6) Mikrotitrasyon yöntemine göre *S.mutans* 1 grubunda en yüksek biyofilm oluşumu G-ænial` da, en düşük biyofilm oluşumu ise Equia Forte`de tespit edilmiştir.

7) Mikratitrasyon yönteminde biyofilm oluşumunun en düşük olarak görüldüğü Equia Forte de bakteri sayısı çok yüksek bulunmuştur. Burada biyofilmin düşük olmasına rağmen bakteri sayısının yüksek çıkmasını boyama yönteminin ve Equia Forte'nin yapısal özelliğine bağlı olarak boyayı adsorbe etmesi ile ilişkilendirmekteyiz.

8) Biyofilmdeki bakteri sayısına bakıldığında restoratif materyaller içinde en yüksek Equia Forte ve en düşük Lava'da tespit edilmiştir. Tespit edilen bakteri sayıları en düşükten en yükseye doğru Lava, Emax, Ælite all purpose body, Clearfil majesty ES , hidroksiapatit, Sonic fill 2, Beatiful II, G-ænial, Equia Forte şeklinde sıralanmıştır.

9) Biyofilmdeki *S.mutans* 1 sayıları hidroksiapatitte, Beautiful II ve G-ænial'da yüksek olmuştur. Ancak Emax ve Lava'da bakteri sayımları ile spektrofotometrik değerler birbirleri ile uyumlu en düşük olarak tespit edilmiştir.

10) Biyofilm oluşum miktarı restoratif materyallerin yapısına göre önemli ölçüde değişmiştir.

11) Restoratif materyallerdeki biyofilm oluşumu pH ile ilişkili olmamıştır.

12) Flor salınımı olan Equia Forte ile Beautiful II de bakteri sayımları yüksek bulunmuştur. Florun inhibe edici etkisi görülmemiştir.

13) Probiyotik bakteri olan *L.rhamnosus* 12, Emax, Lava ve hidroksiapatitte çok düşük biyofilm oluştururken diğer restoratif materyallerde değişen oranlarda biyofilm oluşturmuştur. Ancak biyofilm miktarı *S.mutans* 1' in oluşturduğu biyofilm miktarından çok düşüktür. Bu durum SEM görüntüleri ile doğrulanmıştır.

14) *L.rhamnosus* 12, *S.mutans* 1 `nin restoratif materyaller üzerinde biyofilm oluşumunu önemli ölçüde engellenmiştir.

15) *L.rhamnosus*12'nin salgıladığı metabolik ürünler ( fitreli uygulama) *S.mutans* 1 `nin restoratif materyallerde biyofilm oluşumunu çok daha önemli ölçüde engellemiştir.

## 7. KAYNAKLAR

1. Ferracane JL. Resin composite state of the art. *Dent Mater* 2011; 27(1):29-38.
2. Frost PM, An Audit on The Placement and Replacement of Restorations in a General Dental Practice. *Primary Dental Care*, 2002; 9:31-36(6).
3. Sakaguchi RL. Review of the current status and challenges for dental posterior restorative composites: clinical, chemistry, and physical behavior considerations. Summary of discussion from the Portland Composites Symposium (POCOS) June 17-19, 2004, Oregon Health and Science University, Portland, Oregon. *Dent Mater*. 2005; 21(1):3-6.
4. Imazato, S. Bio-active restorative materials with antibacterial effects: New dimension of innovation in restorative dentistry. *Dent. Mater. J.* 2009; 28:11–19.
5. Cheng, L.; Weir, M.D.; Zhang, K.; Arola, D.D.; Zhou, X.; Xu, H.H. Dental primer and adhesive containing a new antibacterial quaternary ammonium monomer dimethylaminododecyl methacrylate. *J. Dent.* 2013; 41: 345–355.
6. Wang S, Zhang K, Zhou X, Xu N, Xu HH, Weir MD, Ge Y, Wang S, Li M, Li Y, Xu X, Cheng L. Antibacterial effect of dental adhesive containing dimethylaminododecyl methacrylate on the development of *Streptococcus mutans* biofilm. *Int J Mol Sci.* 2014; 18;15(7):12791-806.
7. Deligeorgi V, Mjor IA, Wilson NH. An overview of reasons for the placement and replacement of restorations. *Prim Dent Care*. England 2001; 8:5-11.
8. Braga SRM, Vasconcelos BT, Macedo MRDP, Martins VRG, Sobral MAP. Reasons for placement and replacement of direct restorative materials in Brazil. *Quintessence Int* 2007; 38:189-94.
9. Hahnel S, Rosentritt M, Handel G, Bürgers R. Surface characterization of dental ceramics and initial streptococcal adhesion in vitro. *Dent Mater* 2009; 25:969-75.
10. Auschill TM, Artweiller NB, Brex M, Reich E, Sculean A, Netuschil L. The effect of dental restorative materials on dental biofilm. *Eur J Oral Sci* 2002; 110:48-53.
11. Beyth N, Bahir R, Matalon S, Domb AJ, Weiss EI. *Streptococcus mutans* biofilm changes surface-topography of resin composites. *Dent Mater* 2008; 24:732-736.

12. Carvalho RM, Pereira JC, Yoshiyama M, Pashley DH. A review of polymerisation contraction: the influence of stress development versus stress relief. *Oper Dent* 1996; 21:17-24.
13. Collins CJ, Bryant RW, Hodge KL. A clinical evaluation of posterior composite resin restorations: 8-year findings. *J Dent* 1998; 26:311-317.
14. Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner AC, et al. The human oral microbiome. *Journal of bacteriology* 2010; 192: 5002–5017.
15. Wade WG, The oral microbiome in health and disease *Pharmacological Research* 2013; 69(1):137-143.
16. Bowen WH, Koo H. Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms, *Caries Res.* 2011;45(1):69-86.
17. Koo H, Falsetta ML, Klein MI, The Exopolysaccharide Matrix: A Virulence Determinant of Cariogenic Biofilm. *J Dent Res*, 2013, 92(12): 1065-1073.
18. Sousa RP, Zanin JC, Lima JP, Vasconcelos SM, Melo MA, Beltrão HC, et al. In situ effects of restorative materials on dental biofilm and enamel demineralization. *J Dent* 2009; 37:44-51.
19. Otten MPT, Busscher HJ, van Hoogmoed CG, Abbas F, van der Mei HC, Oral biofilm as a vehicle for chemotherapeutic agents. In, Jakubovics NS and Palmer Jr RJ ed. *Oral microbial ecology current research and new perspectives*. Caister Academic Press. Norfolk, UK, 2013, pp. 205-214.
20. Bhardwaj P. and Krishnappa S. Various approaches for prevention of Dental caries with emphasis on probiotics: A review. *IOSR J. Dental and Medical Sci.* 2014; 13(2):62-67.
21. FAO/WHO Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Working Group Report. 2002.
22. Dayangaç GB. Kompozit rezin restorasyonlar. Güneş Kitabevi, Ankara 2000.
23. Roberson TM, Heymann H, Swift EJ, Sturdevant CM. *Sturdevant's art and science of operative dentistry*, 5th ed. ed. Elsevier Mosby, Edinburgh. 2006.
24. Craig RG, Powers JM, Wataha JC. *Dental materials : properties & manipulation*, 7th ed. / Robert G. Craig, John M. Powers, John C. Wataha. ed. Mosby, St. Louis ; London. 2000.

25. Moszner N, Salz U. New developments of polymeric dental composites. *Progr Polym Sci* 2001; 26:535–76.
26. Gladwin MA, Bagby MD. *Clinical aspects of dental materials : theory, practice, and cases*, 3rd ed. ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa. ; London.2009.
27. Arıkan S., *Posterior Kompozitler*, Cumhuriyet Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, 2005.
28. Alla RK. *Dental Materials Science*, Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd., New Delhi, India. 2013. s: 388.
29. Hervas-García A, Martínez-Lozano MA, Cabanes-Vila J, Barjau- Escríbano A, Fos-Galve P. Composite resins. A review of the materials and clinical indications. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 2006; 11,E215-220.
30. Önal B. *Diş Hekimliğinde Maddeler ve Uygulamaları*, 9th ed. ed. Ege Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Yayınları, İzmir. 2004.
- 31 Puckett AD, Fitchie JG, Kirk PC, Gamblin J. *Direct Composite Restorative Materials*. *Dental Clinics of North America*.2007;51(3):659-675.32. Powers JM, Wataha JC, Craig RG. *Dental materials : properties and manipulation*, 9th ed. ed. Elsevier Mosby, St. Louis, Mo. ( London). 2008.
33. Ferracane JL. *Materials in dentistry : principles and applications*, J.B. Lippincott, Philadelphia. 1995.
34. Noort RV.*An introduction to dental materials*, 3rd ed. ed. Mosby, Edinburgh. 2007.
35. McCabe JF, Walls A. *Applied dental materials*, 9th ed. ed. Blackwell, Oxford. 2008.
- 36.O'Brien WJ. *Dental materials and their selection*, 4th ed. ed. Quintessence Pub. Co., Hanover Park, Ill. ; London.2008.
37. Nicholson JW.*The chemistry of medical and dental materials*, Royal Society of Chemistry, Cambridge. 2002.
38. Chen F and Wang D. Novel technologies for the prevention and treatment of dental caries: a patent survey. *Expert Opin Ther Pat*. 2010; 20:681-694.
39. Zimmerli B, Strub M, Jeger F, Stadler O, Lussi A. Composite materials: composition, properties and clinical applications. A literature review. *Schweiz Monatsschr Zahnmed*. 2010; 120(11): 972-86.
40. Sakaguchi R L, ve Powers JM. *Craig's restorative dental materials*. Elsevier Health Sciences. 2012.
41. Lu H, Lee YK, Oguri M, Powers JM. Properties of a dental resin composite with a spherical inorganic filler. *Oper Dent*, 2006; 31: 734-740.



42. Mitra SB, Wu D, Holmes BN. An application of nanotechnology in advanced dental materials. *Journal of the American Dental Association* 2003; 134 (10): 1382-1390.
43. Eastman J, Siegel RW. Nanophase synthesis assembles materials from atomic clusters. *Res Devel Jan* 1989; 56-60.
44. Kirk RE, Othmer DF, Kroschwitz J, Howe-Grant M. *Encyclopedia of chemical technology*. 4th ed. New York: Wiley; 1991. p. 397.
45. Roberson TM, Heyman HO, Swift Jr EJ. *Sturdevant's Art & Science of Operative Dentistry* (4th ed.) Mosby, Missouri 2002.
46. Moszner N, Klapdohr S. Nanotechnology for dental composites. *Int J Nanotechnol* 2004; 1:130-56.
47. Müezzinoğlu HR. Kompozit rezinlere renklendirici çözeltiler ve ev tipi beyazlatma materyali uygulanması sonrasında su emilimi, yüzey pürüzlülüğü ve renk değişimlerinin incelenmesi. Yeditepe Üniversitesi, Doktora Tezi, İstanbul, 2008.
48. Albers HF. *Tooth Coloured Restoratives: Principles and Techniques*, Ninth Ed., BC Decker Hamilton, Canada, 2002.
49. Burgess JO, Walker W, Davidson JM. Posterior resin-based composites: Review of the literature. *Pediatric Dentistry*, 2002; 24 (5), 465-479.
50. Willems G, Lambrechts P, Braem M, Vanherle G. Composite resins in the 21st century. *Quintessence Int*, 1993; 24: 641-657.
51. McCabe JF, John F. Çev. Nayır E. *Dişhekimliği Maddeler Bilgisi*. 7.bs. İstanbul, İstanbul Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Yayınları. 1999.
52. Jackson RD, Morgan M. (2000). The new posterior resins and a simplified placement technique. *Journal of the American Dental Association* 1939;131(3): 375-383.
53. Lazarchik DA, Hammond BD, Sikes CL, Looney SW, Rueggeberg FA. Hardness comparison of bulk-filled/transtooth and incremental-filled/occlusally irradiated composite resins. *J Prosthet Dent*, 2007; 98:129-140.
54. El-Safty, S., Silikas, N., & Watts, D. C. Creep deformation of restorative resin-composites intended for bulk-fill placement. *Dental Materials*, 2012; 28(8): 928-935.
55. Ilie N, Bucuta S, Draenert M. Bulk-fill resin-based composites: an in vitro assessment of their mechanical performance. *Oper Dent*, 2013; 38:618-625.
56. Ilie N, Hickel R. Investigations on a methacrylate-based flowable composite based on the SDR technology. *Dent Mater*, 2011; 27:348-355.
57. Park J, Chang J, Ferracane J, Lee IB. How should composite be layered to reduce shrinkage stress: incremental or bulk filling? *Dent Mater*, 2008; 24:1501-1505.

58. Garcia D, Yaman P, Dennison J, Neiva GF. Polymerization Shrinkage and Depth of Cure of Bulk Fill Flowable Composite Resins. *Operative dentistry*. 2013.
59. Benetti A, Havndrup-Pedersen C, Honore D, Pedersen M, Pallesen U. Bulk-Fill Resin Composites: Polymerization Contraction, Depth of Cure, and Gap Formation. *Oper Dent*. 2015 Mar-Apr; 40(2):190-200.
60. Par M, Gamulin O, Marovic D, Klaric E, Tarle Z. Raman Spectroscopic assessment of degree of conversion of bulk-fill resin composites - changes at 24 hours post cure. *Oper Dent*. 2015 May-Jun;40 (3):92-101.
61. Moszner N, Fischer UK, Ganster B, Liska R, Rheinberger V. Benzoyl germanium derivatives as novel visible light photoinitiators for dental materials. *Dental Materials*, 2008; 24(7): 901-907.
62. Bucuta S, Ilie N. Light transmittance and micro-mechanical properties of bulk fill vs. conventional resin based composites. *Clin Oral Investig*, 2014; 18:1991-2000.
63. Vasquez, D. (2012). A new generation Bulk-Fill Composite for Direct Posterior Restorations, *Inside Dentistry*, 2012; 8(5).  
<https://www.aegisdentalnetwork.com/id/2012/05>
64. Wilson AD, Kent BE. A new translucent cement for dentistry. The glass ionomer cement. *Br. Dent J*.1972; 132(4):133-135.
65. Köroğlu A, Ekren O, Kurtoğlu C. Geleneksel ve adeziv dental simanlar hakkında bir derleme çalışması. *Atatürk Üniv Diş Hek Fak Derg* 2012; 22:205-16.
66. McLean JW. The clinical use of glass ionomer cements. *Dental Clinic of North America* 1992; 36:693-711.
67. Mount GJ. Description of glass ionomer cements in Dunitz M. *An atlas of glass ionomer cements: a clinicians guide*, 2<sup>th</sup> ed, London, 1994.
68. Mathis RS, Ferracane JL. Properties of a glass ionomer/resin composite hybrid material. *Dent Mater*. 1989; 5: 355-58
69. Mc Donald RE, Avery DR, Dean JA. *Dentistry For The Child and Adolescent*. 8<sup>th</sup> ed, Mosby, St Louis-USA, 2004.
70. McLean JW, Nicholson JW, Wilson AD. Proposed nomenclature for glass-ionomer dental cements and related materials. *Quintessence Int*, 25: 587-9, 1994.
71. Deepa G, Shobha T. A clinical evaluation of two glass ionomer cements in primary molars using atraumatic restorative treatment technique in India: 1 year follow up. *Int J Paediatr Dent*. 2010 Nov; 20 (6):410-418.

72. Ahovuo-Saloranta A, Hiiri A, Nordblad A, Mäkelä M, Worthington H. Pit and fissure sealants for preventing dental decay in the permanent teeth of children and adolescents. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2008;8:CD001830.
73. Leon H. Prentice, Martin J. Tyas, Michael F. Burrow. The effect of ytterbium fluoride and barium sulphate nanoparticles on the reactivity and strength of a glass ionomer cement. *Dental Materials* 2006;22:746-751.
74. Heffernan MJ, Aquilino SA, Diaz-Arnold AM, Haselton DR, Stanford CM, Vargas MA (2002). Relative translucency of six all-ceramic systems: core and veneer materials, *J. Prosthetic Dent*, 2002; 88 (1): 10-15.
75. Mormann WH, Bindl A (2002). All-ceramic, chair-side computer-aided design/computer-aided machining restorations, *Dental Clinics of North America*, 2002; 46 (2):405-426.
76. Beuer F, Schweiger J, Edelhoff D. Digital dentistry, an overview of recent developments for CAD/CAM generated restorations, *British Dental Journal*, 2008; 204 (9):505-511.
77. Raigrodski AJ (2004). Contemporary materials and technologies for all-ceramic fixed partial dentures: a review of the literature, *J. Prosthetic Dent*, 2004; 92 (6) :557-562.
78. Eryürük SE, Farklı üretim tekniği ve materyaller kullanılarak üretilen estetik post-kor sistemlerinin kırılma dayanıklılığının in vitro olarak incelenmesi Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora tezi, Ankara. 2013.
79. Harder S, Wolfart S, Eschbach S, Kern M. Eight-year outcome of posterior inlay-retained all-ceramic fixed dental prostheses, *Journal of Dentistry*, 2010; 38 (11): 875-881.
80. Harrer W. Influence of surface defects on the biaxial strength of a silicon nitride ceramic-Increase of strength by crack healing, *Journal of The European Ceramic Society*, 2012; 32 (1): 27-35.
81. Reich S, Schierz O. Chair-side generated posterior lithium disilicate crowns after 4 years, *Clinical Oral Investigations*, 2013; 17(7): 1765-1772.
82. Ritzberger C, Apel E, Höland W. Properties and clinical application of three types of dental glass-ceramics and ceramics for CAD/CAM technologies, *Materials*, 2010; 3: 3700-3713.
83. Kern M, Sasse M, Wolfart S (2012). Ten-year outcome of three-unit fixed dental prostheses made from monolithic lithium disilicate ceramic, *Journal of American Dental Association*, 2012; 143(3):234-240.

84. Scannapieco FA. The oral environment. In: Lamont RJ, Hajishengallis GN, Jenkinson FJ (ed) *Oral Microbiology and Immunology*. Second ed. Washington DC: ASM Press. 2013.
85. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol*. 2005, 43(11):5721-32.
86. Fejerskov O, Kidd EAM. *Dental caries, the disease and its clinical management*. 3rd Edition London, Wiley Blackwell, 2015.
87. Caufield PW, Cutter GR. and Dasanayake, AP. Initial acquisition of mutans streptococci by infants: evidence for a discrete window of infectivity. *J Dent Res*, 1993; 72:37-45.
88. Nolte A. *Oral microbiology with basic microbiology and immunology*, USA, Mosby Company, 1982.
89. Samaranayake L. *Essential microbiology for dentistry*, London, Churchill Livingstone. 2006.
90. Socransky SS and Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol*, 2000, 2012; 28: 12-55.
91. Moore WE, Moore LV. The bacteria of periodontal diseases, *Periodontol* 2000, 1994; 5(1):66-77.
92. Jenkinson HF, Lamont RJ. Oral microbial communities in sickness and in health. *Trends Microbiol*. 2005 Dec; 13(12):589-95.
93. Wilson M. *Microbial Inhabitants of Humans: Their Ecology and Role in Health and Disease*. Cambridge University Press; Cambridge: 2005.
94. Ruby J, Goldner M. Nature of symbiosis in oral disease, *J Dent Res* 2007; 86(1):8-11.
95. Avila M, Ojcius DM, Yilmaz Ö. The Oral Microbiota: Living with a Permanent Guest. *DNA Cell Biol*. 2009; 28(8):405-411.
96. Kolenbrander PE, Palmer RJ Jr. Human oral bacterial biofilms. In: *Microbial biofilms*. Ghannoum M, O'Toole GA, editors. Washington, DC: ASM press, 2004; pp. 85-117.
97. Foster JS, Pan PC, Kolenbrander PE. Effects of antimicrobial agents on oral biofilms in a saliva-conditioned flowcell. *Biofilms* 2004; 1: 5-12.
98. Liljemark W.F. and Bloomquist C. Human oral microbial ecology and dental caries and periodontal diseases. *Crit Rev Oral Biol Med* 1996; 7(2): 180-198.
99. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 1999; 284: 1318-1322

100. Marsh PD. Contemporary perspective on plaque control. *Br Dent J*, 2012; 212: 601-606.
101. Costerton J.W., Cheng K.J., Geesey C.G., Ladd T.I., Nickel J.C., Dasgupta M. And Marrie TJ. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annual review of Microbiology*. 1987, 41; 435-464.
- 102 . . Madigan MT, Martinko JM, Stahl DA, Clark DP. *Brock Biology of Microorganisms* 13th.ed.Pearson International 2015.
103. Marsh PD. Dental plaque as a microbial biofilm. *Caries Res*, 2004; 38: 204–211
104. Davey ME, O'toole GA. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2000; 64:847-867.
105. Watnick P, Kolter R. Biofilm, city of microbes. *J Bacteriol*. 2000 May;182(10):2675-2679.
106. Jenkinson F, Lapin-Scott HM. (2000). Biofilms adhere to stay. *Trends Microbiol*, 2000; 9: 9-10.
107. Sutherland IW. Biofilm exopolysaccharides: A strong and sticky framework. *Microbiology*., 2001; 147: 3-9.
108. Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis*, 2002; 8:881-890.
109. Jayaraman A, Wood TK. Bacterial Quorum Sensing: Signals, circuits, and implications for biofilms and disease. *Annual Review of Biomedical Engineering*. 2008; 10: 145-167.
110. Schauder S., Bassler B. L. (2001). The languages of bacteria. *Genes Dev*. 2001; 15:1468–1480. 10.1101/gad.899601
111. Shih P, Huang C. Effects of quorum sensing deficiency on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and antibiotic resistance. *J Antimicrobiol Chemother*, 2002; 49: 309-314.
112. Goldstone, RJ, Popat R, Fletcher MP, Crusz SA, Diggle SP. Quorum sensing and social interactions in microbial biofilms. In: Lear G, Lewis G (Ed) *Microbial Biofilms Current research and applications*. Caister Academic Press, Norfolk, UK.
113. Saraçlı MA. "Quorum sensing": mikroorganizmalar iletişim mi kuruyor? *Gülhane Tıp Dergisi*, 2006; 48: 244-250.
114. Kolenbrander PE, Palmer RJ, Jr. Periasamy S and Jukubovics NS. Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. *Nat.Rev. microbiol*. 2010. 8;471-480.

115. Ten Cate JM. Biofilms, a new approach to the microbiology of dental plaque. *Odontology*, 2006,94(1):1-9
116. Axelsson P. Diagnosis and risk prediction of dental caries, Germany, Quintessence Publishing, 2000.
117. Godoy GF, Hicks MJ. Maintaining the integrity of the enamel surface: the role of dental biofilm, saliva and preventive agents in enamel demineralization and remineralization. 2008; 139 ( Suppl.):25-34.
118. Sintim H.O. and Gürsoy UK. Biofilm as "connectors" for oral and systems medicine: A new opportunity for biomarkers, molecular targets, and bacterial eradication. *OMICS A J. Integrative Biology*. 2016; 20(1):3-11.
119. Teughels W, Van Assche N, Sliepen I, Quirynen M. Effect of material characteristics an/or surface topography on biofilm development. *Clin Oral Implants Res*, 2006 Oct;17 Suppl 2:68-81.
120. Kolenbrander PE, Andersen RN, Blehert DS, Eglund PG, Foster JS, Palmer RJ JR. Communication among oral bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2002; 66:486-505.
121. Carlen A, Nikdel K, Wennerberg A, Holmberg K, Olsson J. Surface characteristics and in vitro biofilm formation on glass ionomer and composite resin. *Biomaterials* 2001;22:481-487.
122. Montanaro L, Campoccia D, Rizzi S, Donati ME, Breschi L, Prati C, Aricola CR. Evaluation of bacterial adhesion of *Streptococcus mutans* on dental restorative materials. *Biomaterials* 2004; 25:4457-4463.
123. Dezelic T, Guggenheim B, Schmidlin PR. Multispecies biofilm formation on dental materials and an adhesive patch. *Oral Health Prev Dent* 2009; 7:47-53.
124. Kawai K, Urano M. Adherence of plaque components to different restorative materials. *Oper Dent* 2001;26:396-400.
125. Larson TD. Why do we polish? Part one. *Northwest Dent* 2011;90:17-22.
126. Ikeda M, Matin K, Nikaido T, Foxton RM, Tagami J. Effect of surface characteristics on adherence of *S. mutans* biofilms to indirect resin composites. *Dent Mater J* 2007;26:915-923.
127. Quirynen M. The clinical meaning of the surface roughness and the surface free energy of intra-oral hard substrata on the microbiology of the supraand subgingival plaque: results of in vitro and vivo experiments. *J Dent* 1994;22:13-6

128. Brambilla E, Gagliani M, Ionescu A, Fadini L, García-Godoy F. The influence of light-curing time on the bacterial colonization of resin composite surfaces. *Dent Mater* 2009;25:1067-1072.
129. Pereira-Cenci T, Cenci MS, Fedorowicz Z, Marchesan MA. Antibacterial agents in composite restorations for the prevention of dental caries. *Cochrane Database Syst Rev*. 2009;8n(3):CD007819.
130. İlday NÖ, Erdem V, Bayındır YZ. Farklı bitirme ve parlatma işlemlerinin üç farklı resin materyalin yüzey pürüzlülüğü üzerine etkisi. *Atatürk Üniv Diş Hek Fak Derg* 2008;18:19-24.
131. Busscher HJ, Rinastiti M, Siswomihardjo W, van der Mei HC. Biofilm formation on dental restorative and implant materials. *J Dent Res* 2010;89:657-665.
132. Barbosa RP, Pereira-Cenci T, Silva WM, Coelho-de-Souza FH, Demarco FF, Cenci MS. Effect of cariogenic biofilm challenge on the surface hardness of direct restorative materials in situ. *J Dent* 2012;40:359-63
133. Souza SF, Bombana AC, Francci C, Goncalves F, Castellan C, Braga RR. Polymerization stress, flow and dentine bond strength of two resin-based root canal sealers. *International Endodontic Journal*, 2009; 42, 867–73.
134. Aykent F, Yöndem I, Özyeşil AG, Günal SK, Avunduk MC, Özkan S. Effect of different finishing techniques for restorative materials on surface roughness and bacterial adhesion. *J Prosthet Dent* 2010;103:221-227.
135. Steinberg D, Eyal S. Early formation of *Streptococcus sobrinus* biofilm on various dental restorative materials. *J of Dent*. 2002; 30:47-51.
136. Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB. Dental caries, *Lancet*, 2007; 6;369(9555):51-59.
137. Loesche WJ (1986) Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev*. 1986; 50, 353-80.
138. Marsh PD, Martin MV. *Oral microbiology*. 5th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone; 2009.
139. Marsh PD, Takahashi N, Nyvad B. Biofilms in caries development. In: Fejerskov O, Nyvad B, Kidd E, editors. *Dental caries: the disease and its clinical management*. Oxford: Wiley Blackwell; 2015. p. 107–131.
140. Mantzourani, M., Gilbert, S. C., Sulong, H. N., Sheehy, E. C., Tank, S., Fenlon, M. & Beighton, D. (2009). The isolation of bifidobacteria from occlusal carious lesions in children and adults. *Caries Res* 2009; 43: 308–313.

141. Tanner AC, Kent Jr RL, Holgerson PL, Hughes CV, Loo CY, Kanasi E, Chalmers NI, Johansson I. Microbiota of severe early childhood caries before and after therapy. *J Dent Res.* 2011;90:1298–305.
142. Becker MR, Paster BJ, Leys EJ, Moeschberger ML, Kenyon SG, Galvin JL, Boches SK, Dewhirst FE, Griffen AL. Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. *J Clin Microbiol.* 2002;40:1001–1009.
143. Marsh PD, Dental biofilms in health and disease. *Understanding Dental Caries: From Pathogenesis to Prevention and Therapy* / edited by Michel Goldberg Springer International Publishing : Imprint: Springer, 2016.
144. Aas JA, Griffen AL, Dardis SR, Lee AM, Olsen I, Dewhirst FE, Leys EJ, Paster BJ. Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. *J Clin Microbiol.* 2008; 46:1407–17.
145. Caglar E, Sandalli N, Twetman S, Kavaloglu S, Ergeneli S, Selvi S. Effect of yoghurt with *Bifidobacterium* DN-173010 on salivary mutans streptococci and lactobacilli in young adults. *Acta Odont Scand.* 2005;63:317–320.
146. Caglar E, Topcuğlu N, Cildir SK, Sandallı N, Kulekci G. Oral colonization by *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 after exposure to probiotics. *Int. J. Paediatr Dent.* 2009; 19:377-381.
147. Godts C, Loozen G, Quirynen M, Teughels W. Probiotics: a possible tool in oral health care? In, Jakubovics NS and Palmer Jr RJ ed. *Oral microbial ecology current research and new perspectives.* Caister Academic Press. Norfolk, UK, 2013, pp. 215-230.
148. Meurman JH. Probiotics: do they have a role in oral medicine and dentistry? *Eur J Oral Sci* 2005; 113: 188–196.
149. Teughels W, Essche MV, Slipen I, Quirynen M. Probiotics and oral healthcare. *Periodontology* 2000, 2008; 48:111-147.
150. Nagpal R, Kumar A, Kumar M, Behare PV, Jain S, Yadav H, Probiotics, their health benefits and applications for developing healthier foods: a review. *FEMS Microbiol Lett.* 2012, 334: 1-15.
151. Nase L, Hatakka K, Savilahti E, Saxelin M, Ponka A, Poussa T, et al. Effect of longterm consumption of a probiotic bacterium, *Lactobacillus rhamnosus* GG, in milk on dental caries and caries risk in children. *Caries Res* 2001;35:412-420.



152. Rungsri P, Akkarachaneeyakorn N, Wongsuwanlert M, Piwat S, Nantarakchaikul P, and Teanpaisan R. Effect of fermented milk containing *Lactobacillus rhamnosus* SD11 on oral microbiota of healthy volunteers: A randomized clinical trial. *J. Dairy Sci.* 100:7780–7787.
153. Taipale T. · Pienihäkkinen K. · Alanen P. · Jokela J. · Söderling E. Administration of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 in Early Childhood: A Post-Trial Effect on Caries Occurrence at Four Years of Age. *Caries Res* 2013;47:364-372
154. Singh AV, Vyas V, Patil R, Sharma V, Scopelliti PE, Bongiorno G, et al. Quantitative characterization of the influence of the nanoscale morphology of nanostructured surfaces on bacterial adhesion and biofilm formation. *PLoS One* 2011;6:e25029
155. Aminabadi NA, Erfanparast L, Ebrahimi A, and Oskouei SG. Effect of chlorhexidine pretreatment on the stability of salivary lactobacilli probiotic in six- to twelve-year-old children: A randomized controlled trial. *Caries Res.* 2011; 45:148–154.
156. Jindal G. Pandey RK, Agarwal J, Singh M. A comparative evaluation of probiotics on salivary mutans streptococci counts in Indian children. *Eur. Arch. Paediatr. Dent.*, 2011; 12(4):211-215.
157. Lexner M.O., Blomqvist S., Dahlén G., Twetman S. Microbiological profiles in saliva and supragingival plaque from caries-active adolescents before and after a short-term daily intake of milk supplemented with probiotic bacteria—A pilot study. *Oral Health Prev. Dent.* 2010;8:383–388
158. Cildir SK, Germec D, Sandalli N, Ozdemir FI, Arun T, Twetman S, et al. Reduction of salivary mutans streptococci in orthodontic patients during daily consumption of yoghurt containing probiotic bacteria. *Eur J Orthod.* 2009;31:407–4011.
159. 159. Stecksén-Blicks C., Sjöström I., Twetman S. Effect of long-term consumption of milk supplemented with probiotic lactobacilli and fluoride on dental caries and general health in preschool children: A cluster-randomized study. *Caries Res.* 2009;43:374–381
160. Näse L, Hatakka K, Savilahti E, Saxelin M, Pönkä A, Poussa T, Korpela R, Meurman JH. Effect of long-term consumption of a probiotic bacterium, *Lactobacillus rhamnosus* GG, in milk on dental caries and caries risk in children. *Caries Res.* 2001; 35(6):412-420.

161. Ahola AJ, Yli-Knuuttila H, Suomalainen T, Poussa T, Ahlstrom A, Meurman JH, et al. Short-term consumption of probiotic-containing cheese and its effect on dental caries risk factors. *Arch Oral Biol.* 2002; 47:799–804.
162. Pandya D. Benefits of probiotics in oral cavity- A detailed Review. *Ann. Int. Medical and Dental Res.* 2016, 2(3):10-17.
163. Ostengo MC, Nader-Macias EM. Hydroxylapatite beads as an experimental model to study adhesion of lactic acid bacteria from the oral cavity to hard tissues. *Methods Mol Biol* 2004, 268:447-452.
164. Nikawa H, Makihira S, Fukushima H, Nishimura H, Ozaki Y, Ishida K, et al. *Lactobacillus reuteri* in bovine milk fermented decreases the oral carriage of mutans streptococci. *Int J Food Microbiol.* 2004;95:219–223.
165. Caglar E, Cildir SK, Ergeneli S, Sandalli N, Twetman S. Salivary mutans streptococci and lactobacilli levels after ingestion of the probiotic bacterium *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 by straws or tablets. *Acta Odontol Scand.* 2006;64:314–318.
166. Caglar E, Kavaloglu SC, Kuscu OO, Sandalli N, Holgerson PL, Twetman S. Effect of chewing gums containing xylitol or probiotic bacteria on salivary mutans streptococci and lactobacilli. *Clin Oral Investig.* 2007;11:425–429.
167. Caglar E, Kuscu OO, Selvi Kuvvetli S, Kavaloglu Cildir S, Sandalli N, Twetman S. Short-term effect of ice-cream containing *Bifidobacterium lactis* Bb-12 on the number of salivary mutans streptococci and lactobacilli. *Acta Odontol Scand.* 2008;66:154–158.
168. Caglar E, Kuscu OO, Cildir SK, Kuvvetli SS, Sandalli N. A probiotic lozenge administered medical device and its effect on salivary mutans streptococci and lactobacilli. *Int J Paediatr Dent.* 2008;18:35–39.
169. Montalto M, Vastola M, Marigo L, Covino M, Graziosetto R, Curigliano V, et al. Probiotic treatment increases salivary counts of lactobacilli: a double-blind, randomized, controlled study. *Digestion.* 2004;69:53–56.
170. Krasse P, Carlsson B, Dahl C, Paulsson A, Nilsson A, Sinkiewicz G. Decreased gum bleeding and reduced gingivitis by the probiotic *Lactobacillus reuteri*. *Swed Dent J.* 2006;30:55–60.

171. Yli-Knuuttila H, Snall J, Kari K, Meurman JH. Colonization of *Lactobacillus rhamnosus* GG in the oral cavity. *Oral Microbiol Immunol*. 2006;21:129–131.
172. Horz HP, Meinelt A, Houben B, Conrads G. Distribution and persistence of probiotic *Streptococcus salivarius* K12 in the human oral cavity as determined by real-time quantitative polymerase chain reaction. *Oral Microbiol Immunol*. 2007;22:126–130.
173. Samot J, Lebreton J, Badet C. Adherence capacities of oral lactobacilli for potential probiotic purpose. *Anaerobe*, 2011, 17:69-72.
174. Haukioja A, Yli-Knuuttila H, Loimaranta V, Kari K, Ouwehand AC, Meurman JH, et al. Oral adhesion and survival of probiotic and other lactobacilli and bifidobacteria in vitro. *Oral Microbiol Immunol*. 2006;21:326–332.
175. Haukioja A, Loimaranta V, Tenovuo J. Probiotic bacteria affect the composition of salivary pellicle and streptococcal adhesion in vitro. *Oral Microbiol Immunol*. 2008;23:336-343
176. Allaker RP, Douglas CW. Novel anti-microbial therapies for dental plaque-related diseases. *Int J. Antimicrob Agents* 2009; 33(1):8-13.
177. Reddy JJ, Sampathkumar N, Aradhya S. Probiotics in dentistry : review of the current status. *Rev. Clin Pesq Odontol* 2010; 6:261-267.
178. Saha, S. Tomaro- Duchesneau, Tabrizian M. Prakash. Probiotics as oral health biotherapeutics. *Expert Opin Biol Ther*, 2012, 12(9):1207-1220.
179. Tamer, A. Ü., Uçar, F., Ünver, E., Karaboz, D., Bursalıoğlu, M. ve Oğultekin, R. (1989), 3. ve 4. Sınıf Mikrobiyoloji Laboratuvar Kılavuzu, Anadolu Üniversitesi Eğitim Sağlık ve Bilimsel Araştırma Çalışmaları Vakfı Yayınları, Eskişehir, No: 74, 23-25, 240.
180. Akçelik, M., Ayhan, K., Çakır, D., Doğan, H. B., Gürgün, V., Halkman, A., Kaleli, D., Kuleaşan, H., Özkaya, D. F., Tunail, N. ve Tükel, Ç. (2000), *Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları*, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Mikrobiyoloji Birimi, Ankara, 2. Baskı, 229-275, 514-515.
181. Luo G., Samaranayake LP. Yau JYY. *Candida* Species Exhibit Differential In Vitro Hemolytic Activities, *Journal of Clinical Microbiol*, 2001; 39(8): 2971-2974.

182. Doi, K. Phuong, O. T. A., Kawatou, F., Nagayoshi, Y., Fujino, Y. Ve Ohshima, T. Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented rice bran product, *Advances in Microbiology*, 2013;3: 265-272.
183. Freeman DJ, Falkiner FR, Keane C T. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci,” *J. Clin. Pathol.*1989; 42,:872 874.
184. Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B. Svabic-Vlahovic, MA. Modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation, *Journal of Microbiological Methods*, 2000; 40: 175–179.
185. Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, Beachey EH. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol.* 1985 Dec;22(6):996-1006.
186. Clinical and Laboratory Standards Institutes Clinical and Laboratory Standards Institute Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: seventeenth informational supplement. 2007.
187. Kaewnopparat, S., Dangmanee, N., Kaewnopparat, N., Srichana, T., Chulasiri M ve Settharaksa, S. In vitro probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* SK5 isolated from vagina of a healthy woman, *Anaerobe*, 2013; 22: 6-13.
188. González L, Sandoval H, Sacristán N, Castro JM, Fresno JM, Tornadijo ME. Identification of lactic acid bacteria isolated from Genestoso cheese throughout ripening and study of their antimicrobial activity. *Food Control* 2007; 18: 716–722.
189. Bhunia AK, Johnson MC, Ray B. Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*, *Journal of Applied Bacteriology*, 1988; 65: 261-268.
190. Zhu WM, Liu W, WuD Q. Isolation and characterization of a new bacteriocin from *Lactobacillus gasseri* KT7. *Journal of Applied Microbiology*, 2000; 88, 877-886.
191. Liljemark WF, Bloomquist CG, Reilly BE, Bernards CJ, Townsend DW, Pennock AT, Lemoine JL. Growth dynamics in a natural biofilm and its impact on oral disease management. *Adv Dent Res* 1997; 11: 14-23.
192. Marsh PD, Bradshaw DJ. Dental plaque as a biofilm. *J Ind Microbiol* 1995; 15: 169-75.
193. Bowden GHW, Li Y.H., Nutritional influences on biofilm development. *Adv Dent Res* 1997; 11: 81-99.

194. Overman PR. Biofilm: A new view of plaque. The Journal of Contemporary Dental Practice 2000; 1: 1-7.
195. Hanning M. Transmission electron microscopic study of in vivo pellicle formation on dental restorative materials. Eur J Oral Sci.1997;105:422-433.
196. Takahashi N, Nyvad B.The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. J Dent Res 2011; 90:294–303.
197. Lee SH, Choi BK, Kim YJ . The cariogenic characters of xylitol-resistant and xylitol-sensitive *Streptococcus mutans* in biofilm formation with salivary bacteria. Arch Oral Biol 2012; 57:697– 703.
198. Gungor, OE, Kirzioglu Z, Dincer E, Kivanç M. Who will win the race in childrens' oral cavities? Streptococcus mutans or beneficial lactic acid bacteria? Beneficial microbes. 2013; 4 (3); 237-245.
199. Ahmed A, Dachang W, Lei Z, Jianjun L, Juanjuan Q, Yi X, Effect of *Lactobacillus* species on *Streptococcus mutans* Biofilm formation. Pak. J. Pharm.2014; 27: 1523-1528 1523.
200. Chung J, Ha ES, Park HR, Kim S. Isolation and characterization of Lactobacillus species inhibiting the formation of Streptococcus mutans biofilm. Oral Microbiol. Immunol. 2004; 19:214-216.
201. Saarela, M., G. Mogensen, R. Fondén, J. Mättö and T. Mattila- Sandholm. 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. J. Biotechnol.2000; 84:197-215.
202. Taheur FB, Kouidhi B, Fdhila K, Elabed H, Slama RB, Mahdouani K, Bakhrouf A, Chaieb K Anti-bacterial and antibiofilm activity of probiotic bacteria against oral pathogens. Microbial pathogenesis 2016; 97:213-220.
203. Lee SH, Kim YJ, A comparative study of the effect of probiotics on cariogenic biofilm model for preventing dental caries. Arch Microbiol 2014; 196:601–609.
204. Gungor, OE, Kirzioglu Z, Dincer E, Kivanç M. Who will win the race in childrens' oral cavities? Streptococcus mutans or beneficial lactic acid bacteria? Beneficial microbes. 2013. 4 (3); 237-245.
205. Kırzioğlu Z., Dinçer E., Kivanç M., Güngör ÖE. Antibiotic resistance in oral *Streptococcus* spp. isolated from healthy children, Turkey. Medical Microbiology Session. IV. International Conferance on Environmental, Industrial and Applied Microbiology. BioMicroWorld 2011 Torremolinos, Malaga, Spain 14-16 Eylül 2011.

206. Kivanç AK, Kivanç M, Kırzioğlu. Z. Biofilm production and antibiotic resistance of oral *Streptococcus* spp. isolated from healthy children, Turkey. International Union of Microbiological Societies Congresses - XIV<sup>th</sup> International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology Montreal, Canada, Poster no: BAM-PT1018, p: 515, 27 July – 1 August 2014
207. Samot J, Badet C, Antibacterial activity of probiotic candidates for oral health, *Anaerobe*,2013; 19:34-38. doi: 10.1016/j.anaerobe.2012.11.007.
208. Iniesta M, Herrera D, Montero E, Zurbriggen M, Matos AR, Marin MJ, et al. Probiotic effects of orally administered *Lactobacillus reuteri*-containing tablets on the subgingival and salivary microbiota in patients with gingivitis. A randomized clinical trial. *J Clin Periodontol* 2012;39:736-644.
209. Hatakka K, Ahola AJ, Yli Knuuttila H, Richardson M, Poussa T, Meurman JH, Korpela R. Probiotics reduce the prevalence of oral candida in the elderly—a randomized controlled trial. *J. Dent Res.* 2007;86(2):125-130.
210. Simark-Mattsson C, Emilson C-G, Hakansson EG, Jacobsson C, Roos K, Holm S. *Lactobacillus*-mediated interference of mutans streptococci in caries- free v.s. caries-active subjects. *Eur J Oral Sci.* 2007;115(4):308-314.
211. Kivanç AK, Tahtacı S, Kivanç M. Inhibitory activity of lactic acid bacteria against *Streptococcus mutans* and its biofilm . Industrial, medical and environmental applications of microorganisms Current status and trends *Antonio Méndez-Vilas* (Ed).Wageningen Academic Publishers. The Netherlands 2014. pp 535-540. ISBN 978-90-8686-243-6
212. Gilliland, SE. Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria, *FEMS Microbiol. Rev.*,1990. **87**, 175-188.
213. Lewus CB., Kaiser A. Montville JT. Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat,” *Appl. and Environ. Microbiol.* 1991; **57** (6), 1683-1688.
214. Quirynen M,Bollen CML. The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man. *J. Clin Periodontol.*1995; 22:1-14.
215. Shahal Y, Steinberg D., Hirschfeld Z, Bronshteyn M, Kopolovic K. In vitro bacterial adherence onto pellicle-coated aesthetic restorative materials. *Journal of Oral Rehabilitation* 1998; 25; 52–58.

216. Hansel C, Leyhausen G, Mai UE, Geurtsen W. Effects of various resin composite (co)monomers and extracts on two caries-associated micro-organisms in vitro. *J Dent Res* 1998; 77:60-76.
217. Hatibovic-Kofman S, Koch G. Fluoride release from glass ionomer cements in vivo and in vitro. *Swed Dent J* 1991; 15:253-258.
218. Al-Naimi OT, Itota T, Hobson RS, McCabe JF. Fluoride release for restorative materials and its effect on biofilm formation in natural saliva. *J Mater Sci Mater Med* 2008; 19:243-248.
219. Prati C, Fava F, Di Giola D, Seligni M, Pashley DH; Antibacterial effectiveness of dentin bonding systems. *Dent Mater*, 1993; 9:338-343.
220. Palenik CJ, Behnen MJ, Setcoc JC, Miller CH, Inhibition of microbia adherence and growth by various glass ionomers i vitro. *Dent Mater* 1992; 8:16-20.
221. Randall RC. Wilson NH. Glass ionomer restoratives:a systematic review of secondary caries treatment effect. *J. Dent. Res.* 1999; 78:628-637.
222. Seppa L, Korhonen A, Nuutinen A (1995). Inhibitory effect on S.mutans by fluoride-treated conventional and resin-reinforced glass ionomer cements. *Eur J Oral Sci* 103:182-185.
223. Hengtrakool C, Pearson GJ, Wilson M. Interaction between GIC and S.sangius biofilms: antibacterial properties and changes of surface hardness. *J Dent* 2006; 34:588-597.
224. Nicholson JW, Aggarwal A, Czarnecka B, Limanowska-Shaw H. The rate of change of pH of lactic acid exposed to glass-ionomer dental cements. *Biomaterials* 2000; 21:1989-1993.
225. Nakajo K, Imazato S, Takahashi Y, Kiba W, Ebisu S, Takahashi N. Fluoride released from glass-ionomer cement is responsible to inhibit the acid production of caries-related oral streptococci. *Dent Mater* 2009; 25:703-708.
226. Wiegand A, Buchalla W, Attin T. Review on fluoride-releasing restorative materials- Fluoride release and uptake characteristics, antibacterial activity and influence on caries formation. *Dent Mater* 2007; 23:343-362.
227. Svanberg M. Mjör IA. Orstavik D., Mutans streptococci in plaque from margins of amalgam, composite, and glass-ionomer restorations. *J. Dent Res.*1990; 69 (3);861-864.

228. Konishi N, Torii Y, Kurosaki A, Takatsuka T, Itota T, Yoshiyama M. Confocal laser scanning microscopic analysis of early plaque formed on resin composite and human enamel *Journal of Oral Rehabilitation* 2003;30:790-795.
229. Persson A, Claesson R, Van Dijken JW. Levels of mutans streptococci and lactobacilli in plaque on aged restorations of an ion-releasing and a universal hybrid composite resin. *Acta Odontol Scand* 2005. 63;21-25.
230. Imazato S, McCabe JF, Tarumi H, Ehara A, Ebisu S -2001-. Degree of conversion of composites measured by DTA and FTIR. *Dent Mater* 17:178–183.
231. Matalon S, Slutzky H, Weiss EI. Surface antibacterial properties of packable resin composites: part 1. *Quintessence Int* 2004; 35:189-193.
232. Major IA, Shen C, Eliasson ST, Richter S. Placement and replacement of restorations in dental practice in Iceland. *Oper Dent* 2002; 27:117-123.
233. Brambilla E, Gangliani M, Ionescu A, Fadini L, Garcia-Goday F. The influence of light-curing time on the bacterial colonization of resin composite surfaces. *Dent Mater* 2009; 25:1067-1072
234. Takahashi Y, Imazato S, Russell RRB, Noiri Y, Ebisu S. Influence of resin monomers on growth of oral streptococci. *J Dent Res* 2004;83:302-306.
235. Riedewald F. Bacterial adhesion to surfaces: the influence of surface roughness. *PDA J Pharm Sci Technol* 2006;60:164-171.
236. Kawai K, Urano M, Ebisu S. Effect of surface roughness of porcelain on adhesion of bacteria and their synthesizing glucans. *J Prosthet Dent* 2000; 83:664-667.
237. Hahn R, Weiger R, Netuschil L, Bruch M. Microbial accumulation and vitality on different restorative materials. *Dent Mater* 1993; 9:312-316.
238. Meier R, Gerspace HH, Meyer LJ. Adhesion of oral streptococci to all-ceramics dental restorative materials in vitro. *J Mater Sci*: 2008;19: 3249 –53.
239. Kawai K, Tsuchitani Y (2000). Effects of resin composite components on glucosyltransferase of cariogenic bacterium. *J Biomed Mater Res* 51:123-127.
240. Tong Z, Zhou L, Li J, Kuang R, Lin Y, Ni L. 2012. An in vitro investigation of *Lactococcus lactis* antagonizing cariogenic bacterium *Streptococcus mutans*. *Arch. Oral Biol.* 2012; 57: 376-382.
241. Kumada M, Senpuku H, Motegi M, Nakao R, Yonezawa H, Yamamura H, Watanabe H, Tagami J, Effects of *Enterococcus faecium* on *Streptococcus mutans* biofilm formation using flow cell system. *J.Oral Biosci*, 2008; 50(1) : 68-76.



242. Filoche SK, Anderson SA, and Sissons CH. Biofilm growth of *Lactobacillus* species is promoted by *Actinomyces* species and *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol. Immunol* 2004;19: 322-326.
243. Keller MK, Twetman S, Acid production in dental plaque after exposure to probiotic bacteria. *BMC Oral Health* 2012; 12-44
244. Soderling EM, Marttinen AM, Haukioja AL (2011). Probiotic lactobacilli interfere with *Streptococcus mutans* biofilm formation in vitro. *Curr Microbiol* 62(2):618-622.
245. Michalek SM, McGhee JR., Shiota T, Devenyns D. Low sucrose levels promote extensive *Streptococcus mutans* induced dental caries. *Infect Immun* 1977. 16:712-714.
246. Tanzer JM, Freedman ML, Fitzgerald RJ, Virulence mutants defective in glucosyltransferase, dextran-mediated aggregation, or dextranase activity. In: *Molecular basis of oral microbial adhesion*. Mergenhagen SE, Rosan B. ED. Washington, DC. American Society for Microbiology 1985.pp 204-211.
247. Munro CI, Michalek SM, Macrina FL. Sucrose derived exopolymers have site dependent roles in *Streptococcus mutans* promoted dental decay. *FEMS Microbiol. Lett.* 1995; 128:327-332.
248. Banas JA, Vickerman MM. Glucan-binding proteins of the oral streptococci. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003; 14:89–99.
249. Chung J, Ha ES, Park HR, Kim S. Isolation and characterization of *Lactobacillus* species inhibiting the formation of *Streptococcus mutans* biofilm. *Oral Microbiol. Immunol.* 2004;19:214-216.
250. Ishihara K, Miyakawa H, Hasegawa A, Takazoe I, Kawai Y,. Growth inhibition of *Streptococcus mutans* by cellular extracts of humanintestinal lactic acid bacteria. *Infect Immun* 1985; 49:692-694.
251. Twetman L, Larsen U, Fiehn N-E, Stecksén-Blicks C, Twetman S. Coaggregation between probiotic bacteria and cariesassociated strains: an in vitro study. *Acta Odontol Scand* 2009; 67: 284–288.
252. Lang C, Böttner M, Holz C, Veen M, Ryser M, Reindl A, Pompejus M, Tanzer JM Specific lactobacillus/mutans streptococcus co-aggregation. *J Dent Res* 2010; 89:175–179.

253. Wen ZT and Burne RA. Lux- mediated signaling in *Streptococcus mutans* is involved in regulation of acid and oxidative stress tolerance and biofilm formation. *J. Bacteriol.* 2004;186 (9):2682-2691.
254. Tahmourespour A and RK Kermanshahi The effect of a probiotic strain (*Lactobacillus acidophilus*) on the plaque formation of oral Streptococci. *Bosn. J. Basic Med. Sci.*, 2011; 11(1): 37-40.
255. Dimitrijevic R, Stojanovic M, Zivkovic I, et al. The identification of a low molecular mass bacteriocin, rhamnosin A, produced by *Lactobacillus rhamnosus* strain 68. *J. Appl Microbiol* 2009;107:2108-2115
256. Lin X, Chen X, Chen Y, Jiang W. Chen H. The effect of five probiotic lactobacilli strains on the growth and biofilm formation of *Streptococcus mutans*. *Oral Diseases* 2015; 21:e128-e134.
257. Koo H, Xiao J, Klein MI, Jeon JG. Exopolysaccharides produced by *Streptococcus mutans* glucosyltransferases modulate the establishment of microcolonies within multispecies biofilms. *J Bacteriol.* 2010;192:3024–3032.
258. Kreth J, Zhu L, Merritt J, Shi, W. & Qi F. Role of sucrose in the fitness of *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol Immunol* 2008; 23, 213–219.
259. Khalichi P, Singh J, Cvitkovitch DG, Santerre JP. The influence of triethylene glycol derived from dental composite resins on the regulation of *Streptococcus mutans* gene expression. *Biomaterials.* 2009;30:452-459.
260. Benderli Y, Ulukapi H, Balkanli O, Külekçi G. *In vitro* plaque formation on some dental filling materials. *J Oral Rehabil* 1997;24:80-83.
261. Fúcio SBP, Carvalho FG, Correr-Sobrinho L, Sinhoreti MAC, Puppini-Rontani RM. The influence of 30-day-old *Streptococcus mutans* biofilm on the surface of esthetic restorative materials—An in vitro study. *Journal of dentistry.* 2008; 36:833–839.
262. Fúcio SBP, Puppini-Rontani RM, Carvalho FG, Mattos-Graner RO, Correr-Sobrinho L, Garcia-Godoy F. Analyses of biofilms accumulated on dental restorative materials. *Am J Dent.* 2009;22:131-136
263. Padovani GC, Fúcio SBP, Ambrosano GMB, Sinhoreti MAC, Puppini-Rontani RM. In Situ Surface Biodegradation of Restorative Materials. *Operative Dentistry.* 2014;39(4): 349-360.

264. Park JW, Song CW, Jung JH, Ahn SJ, Ferracane JL. The Effects of Surface Roughness of Composite Resin on Biofilm Formation of *Streptococcus mutans* in the Presence of Saliva. *Operative Dentistry*.2012; 37(5): 532-539.
265. Al Moaleem MM, Dorout IS, Elamin EFI, Mattoo KA, Al Ghazali N. Biofilm Formation on Dental Materials in the Presence of Khat:Review: *JSM Dent*.2017; 5(2): 1087.
266. Gharechahi M, Moosavi H, Forghani M. Effect of Surface Roughness and Materials Composition on Biofilm Formation. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*.2012;3: 541-546.
267. Lin NJ , Keeler C, Alison M. Kraigsley AM, Ye J, Lin-Gibson S. Effect of dental monomers and initiators on *Streptococcus mutans* oral biofilms.*Dent mater*. 2018;34(5);776-785.
268. Derchi G, Vano M, Barone A, Covani U, Diaspro A, Salerno M. Bacterial adhesion on direct and indirect dental restorative composite resins: An in vitro study on a natural biofilm. *J.Prosthetic Dent* 2017; 117(5):669-676.

## 8.ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Adı	Alp Kayahan	Soyadı	KIVANÇ
Doğum Yeri	Erzurum	Doğum Tarihi	07.02.1986
Uyruğu	T.C.	TC Kimlik No	13029042876
E-mail	akkivanc@yahoo.com	Tel	05324688659

### Öğrenim Durumu

Derece	Alan	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora	Restoratif Diş Tedavisi	Yeditepe Üniversitesi	2018
Yüksek Lisans			
Lisans	Diş Hekimliği	Yeditepe Üniversitesi	2010
Lise	MF	Eskişehir Fatih Anadolu Lisesi	2004

### Bilimsel Çalışmaları

#### Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (*Proceedings*) basılan bildiriler

1. **Kıvanç AK.**, Tahtacı S., Kıvanç M. 2013. Inhibitory Activity Of Lactic Acid Bacteria Against *Streptococcus Mutans* And Its Biofilm V International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology - BioMicroWorld2013, Madrid, İspanya.
2. **Kıvanç AK**, Kıvanç M, Kırzioğlu. Z. 2014. Biofilm production and antibiotic resistance of oral Streptococcus spp. isolated from healthy children, Turkey. International Union of Microbiological Societies Congresses - XIV<sup>th</sup> International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology Montreal, Canada, Poster no: BAM-PT1018, p: 515, 27 July – 1 August 2014, (poster sunumu).
3. **Kıvanç A.K**, Genç H, Kıvanç M. Effect of zingiber officinale essential oil on biofilm. International Congress of Stomatology.2-6 October 2015. Havana,Cuba. 2015
4. **Kıvanç A.K**, Genç H, Kıvanç M. Biofilm production of oral enterococcus spp. isolated from healthy children, TURKEY International Congress of Stomatology.2-6 October 2015. Havana,Cuba. 2015
5. **Kıvanç A K**, Genç H, Kıvanç M, Kırzioğlu Z. Effect of Essential oil from *Zingiber officinale* on Biofilms of *Streptococcus mutans*. 47 h Meeting of the continental European Division of the International Association for Dental research (CED-IADR). October 15-17, 2015 Antalya, 2015.

**6. Kıvanç, A.K.,** Güler B., Kırzioğlu, Z. Kıvanç, M., Determination of *Staphylococcus* species of Dental Plaque Biofilms and Their antibiotic susceptibility.18.Asia-Pacific Dental and Oral Care Congress. Dental care 2016. November 21-23, 2016, Melbourne, Australia.(Poster Bildiri).

**Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar**

**1. Kıvanç AK,**Tahtacı S, Kıvanç M. Inhibitory activity of lactic acid bacteria against *Streptococcus mutans* and its biofilm . Industrial, medical and environmental applications of microorganisms Current status and trends *Antonio Méndez-Vilas* (Ed).Wageningen Academic Publishers. The Netherlands 2014. pp 535-540. ISBN 978-90-8686-243-6

**Diğer (Görev Aldığı Projeler/Sertifikaları/Ödülleri)**

Bazı oral bakterilerin biyofilm oluşturma potansiyellerinin incelenmesi. Anadolu Üniversitesi BAP projesi . 2015-2016 Tamamlandı . Araştırmacı.