

بررسی آزمایشگاهی تأثیر آنزیم پروتئاز بر پیشگیری از تشکیل بیوفیلم توسط استرپتوکوکوس موتانس جداسازی شده از پلاک دندان

۱. کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.
۲. نویسنده مسؤول: استادیار، گروه میکروبیولوژی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.
Email: nafiseh_naghavy@yahoo.com
۳. استادیار، گروه میکروبیولوژی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.

نیلوفر رنجکش^۱

نفیسه سادات نقوی^۲

مریم محمدی سیجانی^۳

چکیده

مقدمه: باکتری‌های رشد یافته در پلاک دندان مقاومت افزایش یافته‌ای به عوامل ضد میکروبی پیدا کرده‌اند. این مطالعه با هدف بررسی کاهش بیوفیلم تشکیل شده توسط استرپتوکوکوس موتانس جداسازی شده از پلاک دندان در اثر آنزیم پروتئاز انجام شد.

مواد و روش‌ها: باکتری استرپتوکوکوس موتانس از پلاک دندان در محیط Blood agar جداسازی و با آزمون‌های بیوشیمیایی و توالی‌یابی ژن کدکننده ۱۶S rRNA شناسایی گردید. بیوفیلم‌های باکتریایی در چاهک‌های میکروتیتر پلیت در محیط Triptic soy broth غنی شده با ۱ درصد سوکروز پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد ایجاد شد. سپس حجم معادل ۱/۱۲، ۲/۲۴ و ۴/۴ واحد آنزیم پروتئاز در چاهک بر اساس پروتکل شرکت سازنده به طور جداگانه بر روی بیوفیلم‌های تازه تشکیل شده در چاهک‌های مختلف اضافه شد و تأثیر آن‌ها بر ماندگاری بیوفیلم در مدت زمان‌های ۶۰، ۹۰، ۱۲۰، ۱۵۰ و ۲۱۰ دقیقه با روش اسپکتروفتومتری بررسی گردید. تجزیه و تحلیل نتایج با نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۲۵، بررسی اختلاف میانگین بین گروه‌های مستقل با آزمون Kruskal-Wallis و مقایسه‌ی میانگین‌های جفتی با آزمون Mann-Whitney با سطح معنی‌داری ۹۵ درصد انجام شد.

یافته‌ها: باکتری استرپتوکوکوس موتانس جداسازی شده از پلاک دندان، دارای ۹۹/۸ درصد شباهت با سویه‌ی LPB-۰۲۲۵ بود و بیوفیلم آن در غلظت قند ۱ درصد چسبندگی متوسط داشت. کاهش درصد بیوفیلم حاصل از استرپتوکوکوس موتانس LPB-۰۲۲۵ در هر یک از واحدهای آنزیم دریافتی و در هر یک از بازه‌های زمانی مشاهده شد. بیشترین درصد کاهش بیوفیلم استرپتوکوکوس موتانس LPB-۰۲۲۵ در ۱/۱۲ واحد از آنزیم پروتئاز در مدت زمان ۹۰ دقیقه با ۹۷ درصد کاهش، در میان واحدهای مختلف آنزیم مشاهده شد که درصد کاهش بیوفیلم در این مقدار از آنزیم در مدت زمان ۶۰، ۱۵۰ و ۲۱۰ با یکدیگر اختلاف معنی‌داری داشتند (p value = ۰/۰۰۰۸).

نتیجه‌گیری: آنزیم پروتئاز قادر به کاهش پلاک دندان استرپتوکوکوس موتانس LPB-۰۲۲۵ بود. بررسی اثر واحدهای مختلف این آنزیم بر پلاک دندان مخلوط به منظور کنترل پوسیدگی دندان‌های طبیعی و پیشگیری از بیماری‌های پرودنتال ناشی از پلاک دندان پیشنهاد می‌شود.

کلید واژه‌ها: استرپتوکوکوس موتانس، آنزیم پروتئاز، بیوفیلم، پوسیدگی دندان

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۸/۶

تاریخ اصلاح: ۱۳۹۹/۷/۸

تاریخ ارسال: ۱۳۹۹/۴/۱۷

استناد به مقاله: رنجکش نیلوفر، نقوی نفیسه سادات، محمدی سیجانی مریم. بررسی آزمایشگاهی تأثیر آنزیم پروتئاز بر پیشگیری از تشکیل بیوفیلم توسط استرپتوکوکوس موتانس جداسازی شده از پلاک دندان. مجله دانشکده دندان پزشکی اصفهان. ۱۳۹۹؛ ۱۶ (۴): ۴۳۷-۴۴۷.

مقدمه

پوسیدگی دندان یکی از پرهزینه‌ترین بیماری‌ها در دنیا است (۱) که شیوع آن در کشورهای صنعتی رو به افزایش است و پیشگیری از آن در مراحل اولیه‌ی تشکیل پلاک، بهترین راه‌حل می‌باشد (۲). بر طبق گزارش سازمان جهانی بهداشت، این بیماری بر همه‌ی مردم و در هر سنی اثر می‌گذارد (۳) و تقریباً ۸۰-۹۰ درصد مردم جهان را درگیر خود کرده است (۴). از بین بردن بیوفیلیم دندان‌ی دشوار است و استفاده از تمیزکننده‌های مکانیکی مثل مسواک و یا استفاده از نخ دندان کافی نیست. بنابراین برای بهبود بهداشت دهانی، روش‌هایی لازم است تا بتواند تشکیل بیوفیلیم را مهار کند یا کاهش دهد. *استرپتوکوکوس موتانس*، همیشه فراوان‌ترین ارگانیسم در میان باکتری‌های دهان نیست اما سریعاً می‌تواند بیوفیلیم مولد پوسیدگی را ایجاد کند (۵). این باکتری شایع‌ترین میکروارگانیسمی است که در پلاک دندان‌ی مرتبط با ضایعات پوسیدگی یافت می‌شود (۶، ۷). کنترل فاکتورهای بیماری‌زایی مثل تولید آگزوپلی ساکارید، تشکیل بیوفیلیم و اسیدزایی روش‌های اصلی هستند که می‌توانند برای مقابله با پوسیدگی دندان به کار گرفته شوند (۸). تاکنون عواملی مانند پروبیوتیک‌ها (۹)، گیاهانی همچون زردچوبه (۱۰) و گل میخک (۱۱) و آنزیم‌هایی مانند موتاناز (۱۲)، دکستراناز و دکستروزیم (۱۳) و پروتئاز، آمیلاز و لیپاز (۱۴) جهت کنترل و کاهش پلاک دندان‌ی مورد مطالعه قرار گرفته‌اند.

پروتئازها، دسته‌ای از آنزیم‌ها هستند که می‌توانند پیوندهای پپتیدی در پروتئین‌ها و پلی‌پپتیدها را هیدرولیز کنند (۱۵). پروتئازها بر اساس جایگاه فعال روی سوبسترای پروتئینی به اندوآنزیم و اگزوآنزیم، بر اساس مکانیسم‌های کاتالیتیکی به سرین پروتئاز، آسپارتیک پروتئاز، سیستمین پروتئاز و متالو پروتئاز و بر اساس pH اپتیمم به پروتئازهای اسیدی، قلیایی و خنثی طبقه‌بندی می‌شوند (۱۶). از آنجایی که اگر پلاک دندان‌ی در مراحل اولیه‌ی آن رفع نشود باعث ایجاد پوسیدگی دندان‌ی می‌شود، در این مطالعه، اثر آنزیم پروتئاز بر بیوفیلیم تشکیل شده توسط *استرپتوکوکوس*

موتانس جداسازی شده از پلاک دندان‌ی بررسی گردید و فرضیه‌ی صفر بدین صورت بیان شد که آنزیم پروتئاز نمی‌تواند بیوفیلیم حاصل از باکتری *استرپتوکوکوس موتانس* LPB۰۲۲۵ را کاهش دهد.

مواد و روش‌ها

جداسازی و شناسایی باکتری‌ها:

مطالعه‌ی حاضر از نوع تحلیلی بود که با کد اخلاق ۰۰۸. ۱۳۹۸. IR.IAU.FALA.REC. انجام شد. با رعایت اصول اخلاقی از پلاک دندان‌ی و ضایعات پوسیدگی دندان ۴ نفر که ۳ نفر آن‌ها زن و یک نفر مرد بودند با استفاده از سوآب استریل در جمع ۱۰ نمونه تهیه شد (۱۷، ۱۸). سپس هر کدام از سوآب‌ها به طور جداگانه بر روی محیط کشت Blood agar (Merck, BA, Germany) با ۵ درصد خون به روش خطی کشت داده شد و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد در حضور ۱۰ درصد دی‌اکسیدکربن انکوبه شد (۹). سپس از کلنی‌های مشکوک به *استرپتوکوکوس موتانس*، لام گرم تهیه و خصوصیات میکروسکوپی آن‌ها بررسی گردید. با مشاهده‌ی کوکسی‌های گرم مثبت آزمون‌های بیوشیمیایی کاتالاز، اکسیداز و آزمون تخمیر قندهای مانوز، سوربیتول، سالیسین، ترهالوز و لاکتوز (Merck, Germany) بر روی کلنی‌های جداسازی و خالص‌سازی شده انجام گرفت (۱۹).

برای تأیید جدایه‌های باکتریایی از روش مولکولی PCR (Polymerase chain reaction) استفاده شد (۲۰). برای این منظور ابتدا DNA با روش جوشاندن استخراج گردید (۲۱) و با استفاده از پرایمرهای عمومی ۳'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-۵' F ۲۷ و ۳'-GGTTACCTTGTTACGACTT-۵' R ۱۴۹۲ توالی ۱۵۰۰ جفت بازی در ژن ۱۶S rRNA تکثیر گردید. مراحل دمایی و زمانی تکثیر، شامل ۴ مرحله به ترتیب مرحله‌ی اول دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه، مرحله‌ی دوم با ۶ تکرار دمایی و زمانی شامل ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به

مدت ۶۰ ثانیه، ۵۸ درجه‌ی سانتی گراد به مدت ۵۰ ثانیه و ۷۲ درجه‌ی سانتی گراد به مدت ۶۰ ثانیه، مرحله‌ی سوم با ۳۷ تکرار دمایی و زمانی ۹۴ درجه‌ی سانتی گراد به مدت ۶۰ ثانیه، ۵۶/۵ درجه‌ی سانتی گراد به مدت ۶۰ ثانیه و ۷۲ درجه‌ی سانتی گراد به مدت ۶۰ ثانیه و مرحله‌ی چهارم دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه بود (۲۲).

برای مشخص شدن اندازه‌ی قطعه‌ی تکثیر شده، از روش الکتروفورز ژل آگارز استفاده شد و سپس محصول PCR جهت توالی‌یابی به شرکت تکاپو زیست تهران ارسال گردید و توالی به دست آمده در بانک اطلاعاتی (NCBI) National Center for Biotechnology Information (BLAST) (Basic Local Alignment Search Tool) با سرور مورد جستجو قرار گرفت.

بررسی چسبندگی بیوفیلیم باکتری /ستریتوکوکوس مونتاس:

در این آزمون، توانایی چسبندگی بیوفیلیم باکتری در محیط کشت (Merck, TSB, Germany) Tryptic Soy Broth حاوی ۱ درصد سوکروز، مورد ارزیابی قرار گرفت. باکتری جداسازی شده در این محیط، تلقیح شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی گراد در حضور ۱۰ درصد دی‌اکسید کربن انکوبه شد. سپس از کشت‌های تازه‌ی باکتری سوسپانسیون‌هایی با کدورت معادل کدورت نیم مک فارلند با جذب نوری ۰/۰۸ تا ۰/۱۳ در طول موج ۶۳۰ نانومتر تهیه گردید. پس از آن ۲۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون‌های تهیه شده به چاهک‌های میکروتیتر پلیت ۹۶ خانه‌ای استریل تلقیح گردید. چاهک حاوی TSB قند ۱ درصد بدون باکتری به عنوان کنترل منفی و چاهک حاوی محیط کشت بدون قند همراه با باکتری به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. سپس درب میکروپلیت گذاشته شد و در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت در حضور ۱۰ درصد دی‌اکسید کربن انکوبه گردید. پس از طی این مدت، محلول رویی موجود در هر چاهک دور ریخته شد و هر چاهک با اضافه کردن ۳۰۰ میکرولیتر بافر فسفات نمکی (Bioidea,

Iran) سه بار شستشو داده شد. بین هر مرحله، میکروپلیت تکان داده شد تا سلول‌های پلاتکتونیک جدا شوند. پس از آن میکروپلیت به صورت وارونه بر روی یک دستمال کاغذی قرار گرفت تا کاملاً خشک شود. پس از خشک شدن به هر یک از چاهک‌ها، ۲۰۰ میکرولیتر اتانول ۹۶ درصد اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در مکان ثابتی قرار گرفت تا بیوفیلیم‌های تشکیل شده در مجاورت اتانول (نصر، ایران) تثبیت شوند. پس از آن محتوی هر چاهک تخلیه و به مدت ۲۴ ساعت در دمای آزمایشگاه قرار گرفت تا کاملاً خشک شود. پس از طی شدن ۲۴ ساعت، به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر کریستال ویوله ۲ درصد (Merck, Germany) اضافه شد و ۱۵ دقیقه در مکان ثابتی قرار گرفت. پس از آن میکروپلیت در مسیر آب شهری کاملاً شستشو داده شد به طوری که آب خارج شده از هر چاهک کاملاً بیرنگ باشد. در این مرحله از نظر کیفی تشکیل بیوفیلیم از لحاظ شدت رنگ قابل رؤیت بود. پس از آن میکروتیتر بر روی یک سطح جاذب قرار گرفت تا کاملاً خشک شود. به منظور بررسی تولید کمی بیوفیلیم ۲۰۰ میکرولیتر اسید استیک گلاسیال ۳۳ درصد (Merck, Germany) به هر چاهک تلقیح گردید و در دستگاه الیزا ریدر جذب نوری آن در طول موج ۴۹۲ تا ۶۳۰ نانومتر قرائت گردید و نتایج با چاهک‌های کنترل منفی مقایسه شد. در نهایت دسته‌بندی باکتری‌ها بر اساس جذب نوری (OD) بیوفیلیم به صورت زیر محاسبه گردید (۲۳):

غیر چسبنده: $OD \leq OD_c$

چسبندگی ضعیف: $OD_c < OD \leq 2OD_c$

چسبندگی متوسط: $2OD_c < OD \leq 4OD_c$

چسبندگی قوی: $4OD_c < OD$ (۲۴).

(OD): میانگین جذب نوری یک باکتری و OD_c : میانگین

جذب نوری چاهک‌های شاهد)

بررسی تأثیر آنزیم پروتئاز بر بیوفیلیم تشکیل شده از /ستریتوکوکوس مونتاس جداسازی شده:

پروتئاز مورد استفاده در این بررسی، ساویناز (۲-۷۵۲-۲۳۲ EC با غلظت اولیه ۱۶ U/g) بود. ابتدا /ستریتوکوکوس

کاهش تشکیل بیوفيلم از رابطه $[(C-B)-(T-B))/(C-B)] \times 100$ محاسبه گردید. در این رابطه حروف C، B و T به ترتیب میانگین‌های جذب نوری چاهک‌های کنترل (دارای بیوفيلم اما بدون آنزیم)، چاهک‌های بلانک (بدون بیوفيلم و بدون آنزیم) و چاهک‌های تیمار شده (حاوی آنزیم و بیوفيلم) می‌باشند (۲۵).

تجزیه و تحلیل نتایج با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۲۵ (version 25, IBM Corporation, Armonk, NY) انجام شد. برای بررسی اختلاف میانگین‌های بین چند گروه مستقل (یعنی واحدهای مختلف آنزیم پروتئاز در یک بررسی و همچنین زمان‌های مختلف تأثیر آنزیم) آزمون ناپارامتری Kruskal-Wallis مورد استفاده قرار گرفت. همچنین برای هر غلظت به صورت جداگانه، آزمون Mann-Whitney (به عنوان آزمون تعقیبی) بین هر زوج میانگین‌ها انجام شد که نتایج آن با حروف انگلیسی در جدول ۱ و ۲ مشخص شده‌اند. طبق قرارداد در تمام آزمون‌ها سطح خطای ۵ درصد در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

باکتری جداسازی شده:

کلنی‌هایی با ظاهر محدب، حاشیه‌ی صاف، دارای همولیز آلفا و اندازه‌ی سرسوزنی در محیط BA جداسازی شدند (شکل ۱) و از آن‌ها لام گرم تهیه شد. کلنی‌هایی که ویژگی‌های میکروسکوپی به صورت کوکسی‌های گرم مثبت با آرایش زنجیره‌ای در محیط کشت BA نشان دادند خالص‌سازی گردیدند (شکل ۲). بر اساس نتایج شناسایی مورفولوژیک و بیوشیمیایی دو جدایه‌ی مشکوک به/ستریپتوکوکوس موتانس به دست آمد که بنابر نتایج به دست آمده از توالی‌یابی ژن S ۱۶rRNA در بانک اطلاعاتی NCBI معلوم گردید از بین دو جدایه یکی از آن‌ها به میزان ۹۸/۹ درصد به/ستریپتوکوکوس موتانس LPB۰۲۲۵ شباهت داشت. باند ایجاد شده در الکتروفورز ژل آگارز نیز در شکل ۳ مشخص شده است. میزان چسبندگی این جدایه متوسط ارزیابی گردید.

موتانس جداسازی شده در محیط TSB غنی شده با ۱ درصد قند سوکروز به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت کشت داده شد و از باکتری‌های رشد یافته با استفاده از TSB غنی شده با ۱ درصد سوکروز کدورت نیم مک فارلند تهیه گردید. سپس ۲۵۰ میکرولیتر از کدورت تهیه شده به چاهک میکروپلیت استریل منتقل گردید. درب میکروپلیت گذاشته شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد در حضور ۱۰ درصد دی‌اکسید کربن انکوبه شد. پس از انکوباسیون، مایع رویی درون هر چاهک دور ریخته شد و هر کدام از چاهک‌ها دو مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر بافر فسفات نمکی شسته شدند.

بین هر مرحله، میکروپلیت تکان داده شد تا سلول‌های پلانکتونیک جدا شوند. پس از آن به بیوفيلم‌های تازه تشکیل شده در چاهک‌های یک تا سه، ۳۰۰ میکرولیتر، در چاهک چهار تا شش، ۱۵۰ میکرولیتر و در چاهک‌های هفت تا نه، ۷۵ میکرولیتر آنزیم پروتئاز (Sigma, USA) اضافه گردید. چاهک‌های ده تا دوازده، چاهک‌های شاهد بودند که به آن‌ها هیچ آنزیمی اضافه نشد. بر اساس پروتکل شرکت سازنده، واحد فعالیت این آنزیم به ازای ۳۰۰، ۱۵۰ و ۷۵ میکرولیتر محلول آنزیم پروتئاز به ترتیب برابر با ۴/۴، ۲/۲۴ و ۱/۱۲ واحد در هر چاهک محاسبه شد (۲۵) یک واحد فعالیت آنزیم پروتئاز به عنوان مقداری از آنزیم تعریف می‌شود که ۱ میکرومول آمینوآسید تحت شرایط سنجش استاندارد تولید می‌کند (۲۶). درب میکروپلیت بسته شد و به مدت ۲۱۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت. همین آزمایش با همین واحد فعالیت آنزیم برای زمان‌های ۱۵۰، ۱۲۰، ۹۰ و ۶۰ دقیقه نیز تکرار شد. پس از طی هر مدت زمان، محلول رویی موجود در هر چاهک تخلیه شد و چاهک‌ها با آب شسته شدند و بقیه‌ی مراحل شامل اضافه کردن الکل، رنگ کریستال ویوله و اسید استیک انجام شد (۲۳).

در این مرحله بیوفيلم‌های باقی‌مانده از لحاظ کیفی با توجه به شدت رنگ، قابل تفکیک بودند. برای بررسی کمی حذف بیوفيلم، جذب نوری چاهک در طول موج ۴۹۲ الی ۶۲۰ نانومتر در دستگاه الیزا ریدر خوانده شد و درصد

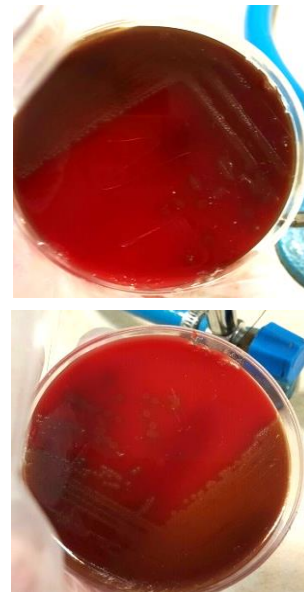
درصد کاهش بیوفیلیم/استرپتوکوکوس موتانس LPB۰۲۲۵
در بین مدت زمان‌های مختلف پس از تیمار به تفکیک واحدهای دریافتی آنزیم:

در جدول ۱، میانگین درصد کاهش بیوفیلیم باکتری *استرپتوکوکوس موتانس* LPB۰۲۲۵ بین مدت زمان‌های مختلف پس از تیمار به تفکیک واحدهای دریافتی آنزیم پروتئاز مقایسه شده است. میانگین درصد کاهش بیوفیلیم باکتری *استرپتوکوکوس موتانس* LPB۰۲۲۵ در ۴/۴ واحد آنزیم پروتئاز در مدت زمان‌های ۶۰، ۹۰، ۱۲۰، ۱۵۰ و ۲۱۰ دقیقه از لحاظ آماری با یکدیگر اختلاف معنی‌دار داشتند ($p \text{ value} = ۰/۰۰۰۷$) در ۲/۲۴ واحد آنزیم پروتئاز در مدت زمان‌های مذکور نیز با یکدیگر اختلاف معنی‌داری داشتند ($p \text{ value} = ۰/۰۰۰۸$) و ۱/۱۲ واحد آنزیم پروتئاز در مدت زمان‌های مذکور نیز با یکدیگر اختلاف معنی‌داری داشتند ($p \text{ value} < ۰/۰۰۰۸$).

همچنین نتایج آزمون ناپارامتری Kruskal-Wallis نشان داد که اختلاف میانگین درصد کاهش تشکیل بیوفیلیم توسط این سویه بین مدت زمان‌های آزمایش از لحاظ آماری معنی‌دار بوده است. بیشترین و کم‌ترین میانگین درصد کاهش بیوفیلیم باکتری پس از دریافت ۴/۴ واحد از آنزیم پروتئاز به ترتیب در زمان‌های ۹۰ دقیقه ($۸۸/۵ \pm ۴/۵$ درصد) و ۲۱۰ دقیقه ($۶۰/۵ \pm ۷/۵$ درصد) به دست آمد. در واحد ۲/۲۴ بیشترین و کم‌ترین درصد کاهش بیوفیلیم به ترتیب در زمان‌های ۹۰ دقیقه ($۹۵/۰ \pm ۰/۰$ درصد) و ۲۱۰ دقیقه ($۶/۴ \pm ۴۷/۷$) مشاهده شد. همچنین بیشترین و کم‌ترین درصد کاهش باکتری در ۱/۱۲ واحد از آنزیم پروتئاز در مدت زمان ۹۰ دقیقه ($۹۷/۰ \pm ۱/۰$ درصد) و ۲۱۰ دقیقه ($۵۱/۵ \pm ۱/۵$ درصد) مشاهده گردید.

درصد کاهش بیوفیلیم/استرپتوکوکوس موتانس LPB۰۲۲۵
پس از دریافت واحدهای مختلف آنزیم پروتئاز به تفکیک زمان‌های مختلف پس از تیمار:

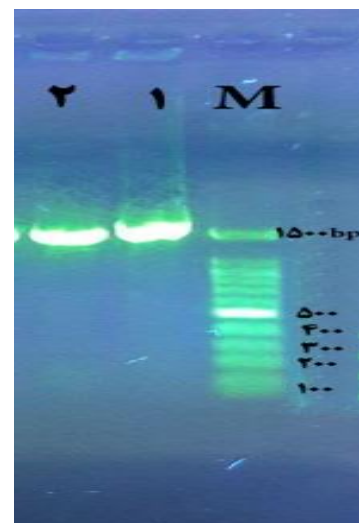
در جدول ۲، میانگین درصد کاهش بیوفیلیم باکتری *استرپتوکوکوس موتانس* LPB۰۲۲۵ پس از دریافت



شکل ۱: نمونه‌هایی از کلنی‌های مشکوک به *استرپتوکوکوس موتانس* در محیط کشت Blood agar



شکل ۲: لام گرم کلنی‌های مشکوک به *استرپتوکوکوس موتانس*



شکل ۳: باند ۱۵۰۰ جفت بازی حاصل از تکثیر توالی ۱۶rRNA در ژل الکتروفورز آگار M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ۱: جدایه‌ی اول، ۲: جدایه‌ی دوم.

مدت زمان ۲۱۰ دقیقه پس از تیمار با هر یک از واحدهای دریافتی آنزیم مذکور این اختلاف معنی دار نبود ($p \text{ value} = ۰/۰۸۲$).

بر طبق نتایج به دست آمده، بیوفیلیم باکتری/استرپتوکوکوس موتانس در ۱/۱۲ واحد از آنزیم پروتئاز در مدت زمان ۹۰ دقیقه پس از تیمار، بیشترین کاهش ($۱/۰ \pm ۹۷/۰$ درصد) و ۲/۲۴ واحد از این آنزیم در مدت ۲۱۰ دقیقه، کمترین کاهش ($۶/۴ \pm ۴۷/۷$ درصد) را نشان داد.

واحدهای مختلف آنزیم پروتئاز به تفکیک زمانهای مختلف پس از تیمار مقایسه شده است. بر طبق نتایج به دست آمده در مدت زمان ۶۰ دقیقه پس از تیمار با هر یک از واحدهای ۴/۴، ۱/۱۲ و ۲/۲۴ از آنزیم پروتئاز اختلاف معنی دار بود ($p \text{ value} = ۰/۰۴۹$). همچنین در مدت زمان ۹۰ دقیقه پس از تیمار ($p \text{ value} = ۰/۰۱۸$)، ۱۲۰ دقیقه پس از تیمار ($p \text{ value} = ۰/۰۰۱$) و ۱۵۰ دقیقه پس از تیمار ($p \text{ value} = ۰/۰۰۲$) این اختلاف معنی دار بود اما در

جدول ۱: مقایسه‌ی میانگین درصد کاهش بیوفیلیم باکتری/استرپتوکوکوس موتانس LPB۰۲۲۵ بین مدت زمان‌های مختلف پس از تیمار به تفکیک واحدهای دریافتی آنزیم پروتئاز

سطح معنی داری**	میانگین درصد کاهش باکتری $\pm$ انحراف استاندارد*	مدت زمان پس از تیمار (دقیقه)	واحد آنزیم پروتئاز
۰/۰۰۰۷***	۷۶/۰ $\pm$ ۲/۰ (b)	۶۰	(U) ۴/۴
	۸۸/۵ $\pm$ ۴/۵ (a)	۹۰	
	۸۱/۰ $\pm$ ۱/۰ (ab)	۱۲۰	
	۸۷/۵ $\pm$ ۱/۵ (a)	۱۵۰	
	۶۰/۵ $\pm$ ۷/۵ (c)	۲۱۰	
۰/۰۰۰۸***	۸۷/۰ $\pm$ ۱۲/۰ (ab)	۶۰	(U) ۲/۲۴
	۹۵/۰ $\pm$ ۰/۰ (a)	۹۰	
	۸۲/۵ $\pm$ ۲/۵ (b)	۱۲۰	
	۷۶/۵ $\pm$ ۴/۵ (b)	۱۵۰	
	۴۷/۷ $\pm$ ۶/۴ (c)	۲۱۰	
< ۰/۰۰۰۸***	۶۹/۷ $\pm$ ۲/۱ (b)	۶۰	(U) ۱/۱۲
	۹۷/۰ $\pm$ ۱/۰ (a)	۹۰	
	۹۶/۰ $\pm$ ۴/۰ (a)	۱۲۰	
	۷۳/۰ $\pm$ ۲/۰ (b)	۱۵۰	
	۵۱/۵ $\pm$ ۱/۵ (c)	۲۱۰	

*: مقایسه‌ی درصد کاهش بیوفیلیم سویه LPB۰۲۲۵ بین واحدهای مختلف آنزیم پروتئاز با استفاده از آزمون Kruskal-Wallis.

***: میانگین گروه‌هایی که دارای حرف انگلیسی مشترک هستند از نظر آماری با یکدیگر معنی دار نیست. مقایسه‌ی میانگین‌های جفتی با استفاده از آزمون تعقیبی Mann-Whitney انجام شده است.

***: اختلاف میانگین بین گروهی در سطح خطای ۵ درصد معنی دار است.

بر طبق نتایج به دست آمده، بیوفیلیم باکتری /ستریتوکوکوس موتانس در ۱/۱۲ واحد از آنزیم پروتئاز در مدت زمان ۹۰ دقیقه پس از تیمار، بیشترین کاهش ($1/0 \pm 97/0$ درصد) و ۲/۲۴ واحد از این آنزیم در مدت ۲۱۰ دقیقه، کمترین کاهش ($4/4 \pm 47/7$ درصد) را نشان داد. مقایسه‌ی درصدهای کاهش نشان داد که با کاهش زمان از ۲۱۰ دقیقه به ۹۰ دقیقه تغییر زیادی در درصد

کاهش بیوفیلیم مشاهده شده است به طوری که به عنوان مثال در مدت زمان ۹۰ دقیقه، میانگین درصد کاهش توسط ۱/۱۲ واحد آنزیم پروتئاز ۹۷ درصد بوده است و در مدت زمان ۲۱۰ دقیقه با همین واحد از آنزیم ($1/12$) $60/5$ درصد کاهش بیوفیلیم مشاهده شد و کمترین درصد کاهش در میان واحدها و زمان‌های مختلف مورد بررسی مربوط به ۲/۲۴ واحد آنزیم در مدت زمان ۲۱۰ دقیقه بود.

جدول ۲: مقایسه‌ی میانگین درصد کاهش بیوفیلیم باکتری /ستریتوکوکوس موتانس LPB۰۲۲۵ پس از دریافت واحدهای مختلف آنزیم پروتئاز به تفکیک زمان‌های مختلف پس از تیمار

مدت زمان پس از تیمار (دقیقه)	واحد آنزیم پروتئاز	میانگین درصد کاهش باکتری $\pm$ انحراف استاندارد*	سطح معنی‌داری
۶۰	۴/۴	(b) $2/0 \pm 76/0$	**۰/۰۴۹
	۲/۲۴	(a) $12/0 \pm 87/0$	
	۱/۱۲	(ab) $2/1 \pm 69/7$	
۹۰	۴/۴	(b) $4/5 \pm 88/5$	***۰/۰۱۸
	۲/۲۴	(a) $0/0 \pm 95/0$	
	۱/۱۲	(a) $1/0 \pm 97/0$	
۱۲۰	۴/۴	(b) $1/0 \pm 81/0$	***۰/۰۰۱
	۲/۲۴	(b) $2/5 \pm 82/5$	
	۱/۱۲	(a) $4/0 \pm 96/0$	
۱۵۰	۴/۴	(a) $1/5 \pm 87/5$	***۰/۰۰۲
	۲/۲۴	(b) $4/5 \pm 76/5$	
	۱/۱۲ واحد	(b) $2/0 \pm 73/0$	
۲۱۰	۴/۴	(a) $7/5 \pm 60/5$	**۰/۰۸۲
	۲/۲۴	(a) $6/4 \pm 47/7$	
	۱/۱۲	(a) $1/5 \pm 51/5$	

*: میانگین گروه‌هایی که دارای حرف انگلیسی مشترک هستند از نظر آماری با یکدیگر معنی‌دار نیست. مقایسه‌ی میانگین‌های جفتی با استفاده از آزمون تعقیبی Mann-Whitney انجام شده است.

***: مقایسه‌ی درصد کاهش بیوفیلیم سویه LPB۰۲۲۵ بین واحدهای مختلف آنزیم پروتئاز با استفاده از آزمون Mann-Whitney. اختلاف میانگین بین گروهی در سطح خطای ۵ درصد معنی‌دار است.

***: مقایسه‌ی درصد کاهش بیوفیلیم سویه LPB۰۲۲۵ بین واحدهای مختلف آنزیم پروتئاز با استفاده از آزمون Kruskal-Wallis. اختلاف میانگین بین گروهی در سطح خطای ۵ درصد معنی‌دار است.

بحث

در مطالعه‌ی حاضر فرضیه‌ی صفر بدین صورت که آنزیم پروتئاز نمی‌تواند موجب کاهش بیوفیلم حاصل از باکتری *استرپتوکوکوس موتانس* LPB۰۲۲۵ شود، مورد تأیید قرار نگرفت. واحدهای مورد بررسی شامل ۴/۴، ۲/۲۴ و ۱/۱۲ بود که میزان تأثیر آن‌ها در زمان‌های ۶۰، ۹۰، ۱۲۰، ۱۵۰ و ۲۱۰ دقیقه مورد بررسی قرار گرفت و پس از آزمایشات صورت گرفته مشخص شد که آنزیم پروتئاز، منجر به کاهش درصد بیوفیلم حاصل از باکتری *استرپتوکوکوس موتانس* LPB۰۲۲۵ می‌شود.

بیشترین درصد کاهش بیوفیلم در هر سه واحد، در مدت زمان ۹۰ دقیقه مشاهده شد.

Molobela و همکاران (۲۵) اثر ۱ u/ml آنزیم پروتئاز (شامل ساویناز، اورلاز و پلاریزم) و ۲ u/ml آنزیم آمیلاز (آمیلوگلوکوزیداز و آمیلاز باکتریایی) را بر بیوفیلم تشکیل شده توسط *سودوموناس فلئوروسنس* بررسی کردند. بر طبق نتایج آن‌ها، اورلاز و ساویناز مؤثرترین فعالیت آنزیمی را در حذف بیوفیلم و تخریب اگزوپلیمر خارج سلولی داشت که احتمالاً به دلیل آن است که پروتئین ترکیب غالب در اگزوپلیمر خارج سلولی بوده است و آنزیم آمیلوگلیکوزیداز و آنزیم آمیلاز باکتریایی اثر کم‌تری بر تخریب کربوهیدرات‌های موجود در اگزوپلیمر خارج سلولی داشتند. در این مطالعه نیز ۱/۱۲ واحد از آنزیم پروتئاز در مدت زمان ۹۰ دقیقه باعث کاهش درصد بیوفیلم باکتری شد.

در مطالعه‌ی Budtz-jørgensen و همکاران (۲۷) اثر آنزیم پروتئاز (آلکالاز) بر مهار تجمع پلاک بر سطح اتصال دندان‌های مصنوعی آزمایش شد. پروتئاز (آلکالاز) در قرص‌هایی حل شدنی حاوی ۱۵، ۳۰، ۶۰، ۱۰۰، ۳۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم آنزیم توزیع شده بود. قرص‌های حاوی آنزیم و قرص‌های بدون آنزیم در ۱۵۰ میلی لیتر آب ۵۰ درجه‌ی سانتی گراد حل شدند و دندان‌های مصنوعی یک‌بار در روز و هر بار به مدت ۱۵ دقیقه به مدت یک هفته با این محلول شسته می‌شدند. آنالیزهای آماری کاهش معنی داری در مقدار

پلاک همراه با افزایش غلظت آنزیم نشان داد. بر طبق نتایج آن‌ها آنزیم پروتئاز باعث کاهش پلاک دندان‌ی شد. اگرچه در این مطالعه اثر ضد بیوفیلمی آنزیم به طور غیر مستقیم مورد بررسی قرار گرفته است، نتایج آن با نتایج بررسی حاضر که پروتئاز باعث کاهش درصد بیوفیلم باکتری *استرپتوکوکوس موتانس* LPB۰۲۲۵ می‌شود، هم‌خوانی داشت.

همچنین Hahn Berg و همکاران (۲۸)، اثر ۱ u/ml کریلاز (نوعی پروتئاز) بر پلاک دندان‌ی تجمع یافته بر سطح دندان‌های مصنوعی در زمان ۲۰ دقیقه را بررسی کردند. داده‌های آن‌ها نشان داد که کریلاز می‌تواند تجمع پلاک را برطرف کند.

در مطالعه‌ی Mugita و همکاران (۲۹) نیز اثر تریپسین پروتئاز، پاپائین و اکتیدین بر تشکیل بیوفیلم و حذف بیوفیلم‌های پوشش زبان حاصل از گونه‌های *اکتینومایسس* با استفاده از روش میکروتیتر پلیت بررسی شد. بیوفیلم *اکتینومایسس* دهانی، همچنین بیوفیلم‌های چندگونه‌ای که شامل *استرپتوکوکوس*، *ویونلا*، *لاکتوباسیلوس*، *پیتواستریپتوکوک*، *پری وتلا* و *هموفیلوس* به طور معنی داری به وسیله‌ی این آنزیم‌ها کاهش یافت.

Lequette و همکاران (۳۰)، اثرات پاک‌کنندگی آنزیم‌های پلی ساکاریداز و پروتئولیتیک شامل سرین پروتئاز، پاپائین، آلفا آمیلاز و پلی ساکاریدازهایی مثل سلولاز، همی سلولاز و بتا گلوکاناز را علیه بیوفیلم دو گونه باکتریایی *سودوموناس فلئوروسنس* و سویه‌های *باسیلوس* سرئوس در صنعت غذایی را مطالعه کردند. داده‌های آن‌ها نشان داد که سرین پروتئاز در حذف بیوفیلم با سلول‌های *باسیلوس* مؤثرتر از پلی ساکاریداز هاست و پلی ساکاریدازها در حذف بیوفیلم *سودوموناس فلئوروسنس* مؤثرتر از سرین پروتئازها بود.

Leroy و همکاران (۳۱) نیز فعالیت ضد بیوفیلمی آنزیم‌های لیپازی، گلیکوزیدازی (شامل آلفا آمیلاز، سلولاز) و پروتئاز (شامل ساویناز و پاپائین) را علیه باکتری بیوفیلم *سودوآلتروموناس* بررسی کردند. آزمایش آن‌ها بر اساس

می‌آید ولی احتمالاً به دلیل پایان یافتن نیمه‌ی عمر آنزیم (۳۳) و تشکیل مجدد بیوفیلم توسط باکتری‌ها بود.

نتیجه‌گیری

با استفاده از ۱/۱۲ واحد از آنزیم پروتئاز در مدت زمان ۹۰ دقیقه، ایجاد بیوفیلم توسط *استرپتوکوکوس موتانس* LPB۰۲۲۵ به میزان ۹۷ درصد کاهش یافت. با توجه به این که پوسیدگی دندان ناشی از عملکرد انواع باکتری‌ها در دهان می‌باشد، بررسی اثر آنزیم مورد بررسی بر پلاک دندانی مخلوط به منظور کنترل پوسیدگی دندان‌های طبیعی، پلاک ایجاد شده بر دندان‌های مصنوعی و پیشگیری از بیماری‌های پریودنتال ناشی از پلاک دندانی پیشنهاد می‌شود.

قدردانی

از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان به علت در اختیار قرار دادن تجهیزات آزمایشگاهی قدردانی می‌شود.

اتصال باکتری‌ها به میکروپلیت بود. نتایج آن‌ها نشان داد که پروتئاز ساویناز، مؤثرترین هیدرولاز در جلوگیری از اتصال باکتری و همچنین حذف باکتری‌های چسبیده بود. در این بررسی نیز آنزیم پروتئاز درصد بیوفیلم *استرپتوکوکوس موتانس* را با توجه نتایج به دست آمده به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش داد.

بنابراین از آنجایی که سایر میکروارگانیسم‌ها نیز در تشکیل پلاک دندانی نقش دارند (۳۲)، پیشنهاد می‌شود بررسی‌های گسترده‌تری روی اثر این آنزیم بر روی سایر باکتری‌های پلاک‌های دندانی و همچنین، انواع بیماری‌های ناشی از بیوفیلم‌های میکروبی انجام شود زیرا در این بررسی تنها تأثیر آنزیم بر روی بیوفیلم یک باکتری بررسی شده است و همچنین اثرات آنزیم‌ها در شرایط *in vivo* نیز باید به دقت بررسی و مطالعه شود. همچنین افزایش زمان و واحد آنزیم پروتئاز به بیش از ۱/۱۲ واحد، موجب تغییر زیادی در درصد کاهش بیوفیلم نشد اگرچه این خود یک مزیت به حساب

References

1. Forssten SD, Björklund M, Ouwehand AC. Streptococcus mutans, caries and simulation models. *Nutrients* 2010; 2(3): 290-8.
2. Singh J, Kumar A, Budhiraja S, Hooda A. Ethnomedicine: use in dental caries. *Braz J Oral Sci* 2007; 6(21): 1308-12.
3. Banas JA. Virulence properties of Streptococcus mutans. *Front Biosci* 2004; 9(10): 1267-77.
4. Liu Y, Xu Y, Song Q, Wang F, Sun L, Liu L, et al. Anti-biofilm activities from *Bergenia crassifolia* leaves against Streptococcus mutans. *Front Microbiol* 2017; 8: 1738.
5. Guhani N, Pandit IK, Gupta M, Josan R. Caries infiltration of non cavitated white spot lesions: A novel approach for immediate esthetic improvement. *Contemp Clin Dent* 2012; 3(Suppl 2): S199-S202.
6. Kulshrestha S, Khan S, Hasan S, Khan ME, Misba L, Khan AU. Calcium fluoride nanoparticles induced suppression of Streptococcus mutans biofilm: an in vitro and in vivo approach. *Appl Microbiol Biotechnol* 2016; 100(4): 1901-14.
7. Peedikayil FC, Remy V, John S, Chandru TP, Sreenivasan P, Bijapur GA. Comparison of antibacterial efficacy of coconut oil and chlorhexidine on Streptococcus mutans: An in vivo study. *J Int Soc Prev Community Dent* 2016; 6(5): 447-52.
8. Krzyściak W, Jurczak A, Kościelniak D, Bystrowska B, Skalniak A. The virulence of Streptococcus mutans and the ability to form biofilms. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2014; 33(4): 499-515.
9. Tahmourespoor A, Kermanshahi K, Salehi R, Nabinejad A. The in vitro effect of Lactobacillus fermentum on connection of oral streptococcal. *Iran J Med Microbiol* 2008; 2(1): 45-51. [In Persian].
10. Hu P, Huang P, Chen MW. Curcumin reduces Streptococcus mutans biofilm formation by inhibiting sortaseA activity. *Arch Oral Biol* 2013; 58(10): 1343-8.
11. Yoo HJ, Jwa SK. Inhibitory effects of β -caryophyllene on Streptococcus mutans biofilm. *Arch Oral Biol* 2018; 88: 42-6.

12. Kelstrup J, Holm-Pedersen P, Poulsen S. Reduction of the formation of dental plaque and gingivitis in humans by crude mutanase. *Eur J Oral Sci* 1978; 86(2): 93-102.
13. Marotta M, Martino A, de Rosa A, Farina E, Carteni M, de Rosa M. Degradation of dental plaque glucans and prevention of glucan formation using commercial enzymes. *Process Biochem* 2002; 38(1): 101-8.
14. Ledder RG, Madhwani T, Sreenivasan P, de Vizio W, McBain AJ. An in vitro evaluation of hydrolytic enzymes as dental plaque control agents. *J Med Microbiol* 2009; 58(4): 482-91.
15. Batra N, Walia M. Production and characterization of alkaline protease from bacteria strains isolated from cotton field. *Afr J Microbiol Res* 2014; 8(7): 702-9.
16. Jisha VN, Smitha RB, Pradeep S, Sreedevi S, Unni KN, Sajith S, et al. Versatility of microbial proteases. *Adv Enzyme Res* 2013; 1(3): 39-51.
17. Hosseini F, Shirazi M, Norouzi J. The effects of antimicrobial agents on planktonic and biofilm strains of *Streptococcus mutans* isolated from dental plaque. *Ofoogh-E-Danesh* 2011; 2(52): 5-13. [In Persian].
18. Soltan Dallal M, Dargahi H, Mehrani F, Sharifi Yazdi M, Rahimiforushani A, Miremadi S. The role of *Streptococcus mutans* in dental caries in two groups of sensitive and resistance children age between 3 to 5 years. *Journal of Payavard Salamat* 2013; 6(6): 467-77. [In Persian].
19. Rahmadoost S, Amini K. Identification of *Streptococcus mutans* isolated from dental plaques based on the presence of *gtf B* gene. *J Isfahan Med Sch* 2015; 33(356): 1804-9. [In Persian].
20. Chen YL, Lee CC, Lin YL, Yin KM, Ho CL, Liu T. Obtaining long 16S rDNA sequences using multiple primers and its application on dioxin-containing samples. *BMC Bioinformatics* 2015; 16(Suppl 18): S13.
21. Shahbazi B, Narenji H. Comparison of four methods of DNA extraction from Gram-negative Gram-positive bacteria. *Zanco J Med Sci* 2014; 15(45): 9-16. [In Persian].
22. Rahnama E, Naghavi N. Optimization of fermented cow meat quality by lactic acid bacteria in batch fermentation. *Journal of Microbial World* 2017; 10(3): 263-74. [In Persian].
23. Jebali N, Rabbani Khorasgani M, Kianfar M, Emami H. Evaluation of the effects of honey, vinegar and rosewater on adhesion and biofilm formation of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. *J Isfahan Dent Sch* 2016; 12(3): 232-47. [In Persian].
24. Stepanović S, Vuković D, Dakić I, Savić B, Švabić-Vlahović M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods* 2000; 40(2): 175-9.
25. Molobela IP, Cloete TE, Beukes M. Protease and amylase enzymes for biofilm removal and degradation of extracellular polymeric substances (EPS) produced by *Pseudomonas fluorescens* bacteria. *Afr J Microbiol Res* 2010; 4(14): 1515-24.
26. Festus FI, Pauline DO, Anthony OA. Production characteristics and molecular properties of protease of *Pediococcus acidilactici* isolated from beef under cold storage. *Microbiol Res J Int* 2018; 24(4): 1-14.
27. Budtz-jørgensen E, Kelstrup J, Poulsen S. Reduction of formation of denture plaque by a protease (Alcalase®). *Acta Odontol Scand* 1983; 41(2): 93-8.
28. Hahn Berg I, Kalfas S, Malmsten M, Arnebrant T. Proteolytic degradation of oral biofilms in vitro and in vivo: potential of proteases originating from *Euphausia superba* for plaque control. *Eur J Oral Sci* 2001; 109(5): 316-24.
29. Mugita N, Nambu T, Takahashi K, Wang PL, Komasa Y. Proteases, actinidin, papain and trypsin reduce oral biofilm on the tongue in elderly subjects and in vitro. *Arch Oral Biol* 2017; 82: 233-40.
30. Lequette Y, Boels G, Clarisse M, Faille C. Using enzymes to remove biofilms of bacterial isolates sampled in the food-industry. *Biofouling* 2010; 26(4): 421-31.
31. Leroy C, Delbarrea C, Ghillebaert F, Compere C, Combes D. Effects of commercial enzymes on the adhesion of a marine biofilm forming bacterium. *Biofouling* 2008; 24(1): 11-22.
32. Aas JA, Griffen AL, Dardis SR, Lee M, Olsen I, Dewhirst FE, et al. Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. *J Clin Microbiol* 2008; 46(4): 1407-17.
33. Banerjee UC, Sani RK, Azmi W, Soni R. Thermostable alkaline protease from *Bacillus brevis* and its characterization as a laundry detergent additive. *Process Biochem* 1999; 35(1-2): 213-9.

The *in vitro* Survey of the Effect of Protease Enzyme on Reduction of Biofilm Produced by *Streptococcus Mutans* Isolated from Dental Plaque

Niloofar Ranjkesh¹

Nafiseh Sadat Naghavi²

Maryam Mohammadi Sichani³

1. MSc Student of Microbiology, Department of Microbiology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

2. **Corresponding Author:** Assistant professor, Department of Microbiology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran. **Email:** nafiseh_naghavy@yahoo.com

3. Assistant professor, Department of Microbiology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

Abstract

Introduction: Bacteria growing in dental plaque have increasing resistant to antimicrobial agents. The present study aimed for reduction of biofilm formation by *streptococcus mutans* isolated from dental plaque by protease enzyme.

Materials & Methods: *Streptococcus mutans* from dental plaque was isolated in Blood agar medium and then was identified by biochemical tests and sequencing of 16S rRNA coding gene. Bacterial biofilms were formed in wells of microtiter plate in Tryptic Soy Broth medium supplemented with 1% sucrose after 48 hrs incubation in 37°C. Then the volumes equal to 1.12, 2.24 and 4.4 units per well of protease was separately added to recently formed biofilms in different wells based on the manufacturer protocol and effects of them was studied on reduction of biofilms in 60, 90, 120, 150 and 210 minutes by spectrophotometer. Mean differences between independent groups were compared with Kruskal-Wallis test and SPSS25 software statistical tests and paired means were compared with Mann-Whitney test at 95% significance level.

Results: *Streptococcus mutans* was isolated from dental plaque had 98.90% similarity to LPB0225 strain and had intermediated adherence. Reduction of biofilm percentage by *Streptococcus mutans* LPB0225 was observed in every of units of enzyme and in every periods of times. The most biofilm percentage reduction by *Streptococcus mutans* LPB0225 was observed in 1.12 units of enzyme in 90 minutes with 97% reduction. Biofilm percentage reduction in 1.12 units of enzyme in 60, 150 and 210 minutes had significantly differences with each other (p value = 0.0008).

Conclusion: The protease enzyme was able to reduce the dental plaque of *Streptococcus mutans* LPB0225. The survey on the effect of this enzyme on mixed dental plaques is suggested to control dental caries and plaques created on dentures, and to prevent periodontal diseases caused by dental plaque.

Key words: *Streptococcus mutans*, Protease enzyme, Biofilm, Dental plaque.

Received: 7.7.2020

Revised: 29.9.2020

Accepted: 27.10.2020

How to cite: Ranjkesh N, Naghavi NS, Mohammadi Sichani M. The *in vitro* Survey of the Effect of Protease Enzyme on Reduction of Biofilm Produced by *Streptococcus Mutans* Isolated from Dental Plaque. J Isfahan Dent Sch 2021; 16(4): 437-447.