

مقایسه اثر مصرف کوتاه مدت کیک پروبیوتیک (باسیلوس کواگولانس) با کیک معمولی بر شمارش استرپتوكوک موتناس بزاق

مریم کوپایی (MD)، ثنا جهانگیر (DDS)، روناک بختیاری (MS)*

۱- گروه بیماری‌های دهان و فک و صورت، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۲- دانشکده دندانپزشکی پردیس بین الملل، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۳- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

دربافت: ۹۷/۱/۱۱، اصلاح: ۹۷/۳/۱، پذیرش: ۹۷/۳/۲۱

خلاصه

سابقه و هدف: مصرف مواد غذایی موجب تغییر فلور دهان می‌شوند. خوارکی‌هایی که باعث رشد استرپتوكوک موتناس شوند، می‌توانند موجب پوسیدگی دندانی شوند. این مطالعه، به منظور بررسی تأثیر مصرف کوتاه‌مدت کیک حاوی باکتری پروبیوتیک بسیلوس کواگولانس (Bacillus Coagulans) بر تعداد استرپتوكوک موتناس بزاق در مقایسه با مصرف کیک معمولی انجام شد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه مقطعی یک سوکور بر روی ۳۰ داولطلب بزرگسال در ۲ گروه اول ابتدا کیک پروبیوتیک (۷۵ گرم روزانه) به مدت ۱ هفته مصرف گردید و ۲ هفته به عنوان دوره wash out در نظر گرفته شد و سپس کیک معمولی به مدت ۱ هفته مصرف گردید. در گروه دوم ابتدا کیک معمولی به مدت ۱ هفته مصرف گردید و آهفته به عنوان دوره wash out در نظر گرفته شد و سپس کیک پروبیوتیک (۷۵ گرم روزانه) به مدت ۱ هفته مصرف گردید. بزاق غیرتحریکی، قبل از شروع مصرف کیک (Baseline) و سپس در پایان دوره‌های مصرف یک هفتاهای کیک‌ها گرفته شد. شمارش کلی‌های استرپتوكوک موتناس بزاق، توسط دستگاه شمارشگر کلی انجام شد.

یافته‌ها: از بین ۳۰ فرد مورد بررسی، ۱۶ نفر (۴۶/۳۳٪) مرد و ۱۴ زن با میانگین سنی ۱۷/۱۵ (۵۳/۳۳٪) سال بودند. تعداد استرپتوكوک موتناس در نمونه‌های بزاق Baseline برابر با 10^{10} CFU/ml ($7/872 \pm 1/430$) و پس از مصرف کیک پروبیوتیک 10^{10} CFU/ml ($4/652 \pm 0/841$) و پس از مصرف کیک معمولی برابر 10^{10} CFU/ml ($3/846 \pm 3/895$) بود. بین شمارش استرپتوكوک موتناس قبل و بعد از مصرف کیک پروبیوتیک، تفاوت آماری معنی‌داری وجود نداشت. در حالیکه پس از مصرف کیک معمولی نسبت به کیک پروبیوتیک، شمارش باکتری $21/39 \pm 3/9$ در مقابل $21/84 \pm 0/84$ به طور معنی‌داری افزایش یافت ($p=0/032$).

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج این مطالعه اضافه کردن باکتری‌های پروبیوتیک به میان‌وعده‌های شیرین و پرصرف، می‌تواند باعث کاهش اثرات سوء مواد غذایی بالقوه پوسیدگی زا مانند کیک‌ها بر سلامت دهان شود.

واژه‌های کلیدی: بزاق، بسیلوس کواگولانس، استرپتوكوک موتناس، پروبیوتیک.

مقدمه

(عو). استرپتوكوک موتناس (S.M) Streptococcus Mutans یک باکتری اسیدوژنیک و یکی از فاکتورهای اتیولوژیک اصلی پوسیدگی دندان در انسان است(۱-۷). در مطالعات گذشته از مخصوصات لبني به عنوان حامل باکتری‌های پروبیوتیک استفاده شده است و تاثیر آنها بر میزان پوسیدگی دندانی و PH محیط دهان مورد بررسی قرار گرفته است(۸-۱۱). از سوی دیگر مطالعاتی در خصوص پروبیوتیک‌های تجاری و تاثیر آن در شمارش استرپتوكوک موتناس در نمونه‌های آزمایشگاهی حاوی ساکاروز انجام شده است که موید کاهش شمارش SM بوده و پیشنهاد این مطالعات، انجام بررسی بیشتر در این زمینه بر روی نمونه‌های انسانی

پروسیستم‌های زنده هستند که در صورت استفاده به صورت مکمل‌های غذایی، می‌توانند اثرات مفیدی بر سلامتی میزبان داشته باشند(۱-۳). پروبیوتیک‌ها دارای اثرات ضد باکتریایی مستقیم هستند که باعث کاهش PH و جلوگیری از رشد انواعی از باکتری‌ها می‌شوند(۴). حفره دهان به عنوان یک اکوسیستم بسیار پیچیده حاوی انواع باکتری‌ها و موجوداتی است که کاهش و یا افزایش هر یک از آنها تاثیرات متفاوتی را بر سلامت حفره دهان بر جا می‌گذارد(۵). این افزایش و کاهش، عموماً مکانیسم‌های بسیار پیچیده‌ای دارد و باکتریهای پروبیوتیک می‌توانند نقش مهمی در تنظیم فلور دهانی داشته باشند

□ این مقاله حاصل پایان نامه ثنا جهانگیر دانشجوی رشته دندانپزشکی عمومی و طرح تحقیقاتی به شماره ۱۱-۳۵۰۱۱-۰۲-۱۶۸-۶۵ دانشگاه علوم پزشکی تهران می‌باشد.

* مسئول مقاله: دکتر مریم کوپایی

بهداشت را به صورت کامل رعایت کنند (۲۵). سپس به منظور کاهش خطاها نخواسته افراد به دو گروه تقسیم شدند. در هر دو گروه قبل از شروع تحقیق، نمونه گیری اولیه تعیین میزان استرپتوکوک های موتابس براز (Baseline) انجام شد. قبل از نمونه گیری از افراد مورد مطالعه خواسته شد که از انجام اعمالی که روی ترشح براز تاثیر می گذارند، مانند خوردن، آشامیدن اجتناب نمایند. با در نظر گرفتن نمونه گیری در یک ساعت مشخص (۷-۸ صبح) انجام شد (۲۶). نمونه گیری از طرف های استریل از قبل توزین شده به روش spitting (افراد به مدت ۶۰ ثانیه براز را در دهان خود جمع آوری کرد و سپس در طرف استریل تف می نماید و این عمل به مدت ۵ دقیقه انجام می شود) جمع آوری شد (۲۷) و سپس نمونه ها در دمای ۲۰-۲۰ درجه سانتیگراد نگهداری گردید.

در گروه اول ۷۵ گرم کیک تجاری پروبیوتیک (دارای باکتری پروبیوتیک باسیلوس کوآگولانس) که دارای تاریخ مصرف مشابه بودند، به مدت یک هفته هر روز به عنوان صبحانه مصرف شد. این گروه از محتوای پروبیوتیک کیک و تفاوت آن با کیک معمولی آگاهی نداشتند (برچسب تجاری با مارک پوشانده شده بود و مطالعه به صورت یک سوکور انجام گرفت). پس از گذشت یک هفته از مصرف کیک پروبیوتیک، مجدداً نمونه های براز دوم به روش توضیح داده شده جمع آوری گردید. پس از آن دو هفته به عنوان دوره wash out در نظر گرفته شد و هیچ کدام از محصولات مذکور استفاده نگردید.

در این گروه در هفته چهارم، مصرف کیک معمولی به عنوان صبحانه، به صورت یک سوکور آغاز گردید و مجدداً پس از یک هفته، نمونه براز سوم جمع آوری گردید. این روال در مورد گروه دوم نیز اجرا شد، با این تفاوت که در هفته اول کیک معمولی و سپس دو هفته به عنوان دوره wash out در نظر گرفته شد و پس از آن در هفته چهارم کیک پروبیوتیک مصرف گردید و نمونه گیری براز طبق روال ذکر شده انجام گردید (شکل ۱).



شکل ۱. شماتیک روش جمع آوری براز در مراحل مختلف هر دو گروه (۰-۳۰ نفر)

نمونه های براز جمع آوری شده در مراحل مختلف جهت شمارش استرپتوکوک های موتابس، کشت داده شدند. برای کشت و شمارش باکتری S.M. ابتدا با استفاده از ۱۰۰ میکرولیتر براز در محیط کشت موتابس-سالیوایروس آگار کشت داده شدند و رقت های تهییه شده در محیط کشت موتابس-سالیوایروس آگار کشت داده شدند و پلیت های کشت به مدت ۴۸ ساعت در جار در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفتند. سپس باکتری های S.M. در رقت های مختلف توسط دستگاه شمارشگر کلنی (colony counter) شمارش شد و میانگین تعداد آنها، به عنوان عدد نهایی IBM SPSS statistics for Windows, version 21.0 استفاده شد. جهت مقایسه شمارش

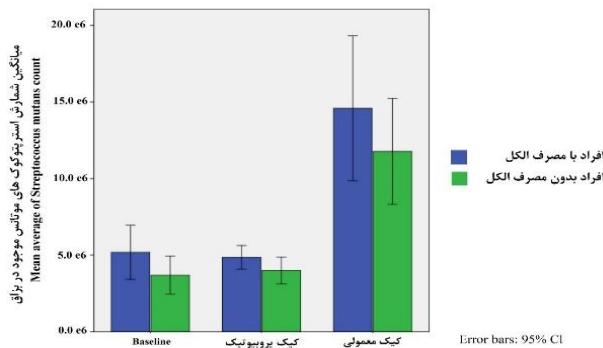
بوده است (۱۲ و ۱۳). باسیلوس کوآگولانس "لاکتوباسیلوس اسپوروژن" سویه گرم مثبت، اسپوردار، متحرک و طبایی شکل می باشد (۱۴). مقاومت و پایداری بالای اسپور این باکتری در مقابل حرارت، فشار و شرایط دشوار محیطی باعث گردیده این باکتری پروبیوتیک در محصولات غیر لبی در مقایسه با سایر گونه های باکتریایی انتخاب شود (۱۵). این باکتری دارای تاییدیه FDA می باشد (۱۶ و ۱۷) و خواص ضد میکروبی پروتئین های تولیدی به وسیله این باکتری تایید گردیده است (۱۸ و ۱۹). با توجه به ارتباط فلور میکروبی اعضای مختلف بدن انسان به یکدیگر، احتمالاً فلور میکروبی دهان پس از مصرف مواد غذایی حاوی باسیلوس کوآگولانس "لاکتوباسیلوس اسپوروژن" دستخوش تغییراتی می شود (۲۰).

از سوی دیگر با توجه به تحقیقاتی که قبلاً در زمینه افزودن این باکتری به فرآورده های نشاسته ای مانند نان انجام شده (۱۵) و همچنین نتایج موفق استفاده از باکتریهای پروبیوتیک در مواد غذایی حاوی ساکاروز (۲۱ و ۲۲)، کیک نیم چاشت بعنوان ماده غذایی حاوی نشاسته و ساکاروز، که برای مصرف جذابیت های فراوانی دارد، مورد استفاده قرار گرفت. اگرچه پوسیدگی پدیده ای مالتی فاکتوریال است و نمی توان با قطعیت ادعا کرد با کاهش باکتری S.M. میزان پوسیدگی کاهش می یابد لیکن این باکتری می تواند یکی از عوامل تاثیر گذار بر سلامت دهان باشد. از آنجاییکه تاکنون تحقیقات کلینیکی برای بررسی تاثیر باکتری پروبیوتیک باسیلوس کوآگولانس در حامل ماده ای غذایی بالقوه پوسیدگی زا مانند کیک و تاثیر آن بر شمارش باکتری های S.M. به عنوان یکی از عوامل موثر بر سلامت دهان، انجام نشده لذا این مطالعه به منظور بررسی اثر مصرف کوتاه مدت کیک پروبیوتیک حاوی باکتری باسیلوس کوآگولانس "لاکتوباسیلوس اسپوروژن" بر شمارش استرپتوکوک موتابس و pH براز افراد بزرگسال در مقایسه با مصرف کیک معمولی و همچنین قبل از مصرف هر گونه کیک (Baseline) انجام شد.

مواد و روش ها

این مطالعه مقطعی یک سوکور به صورت پایلوت پس از تصویب در کمیته اخلاق دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران با کد IR.TUMS.DENTISTRY.REC. ۱۳۹۶.۲۷۵ نتایج مطالعات گذشته و دقت ۵ درصد، خربی اطمینان ۹۵ درصد، خطای نوع دوم $\beta=0.2$ و انحراف معیار 30° برای کشف حداقل اختلاف معنی داری برابر ۱۶ واحد، حجم نمونه مورد نیاز 30° نفر براورد گردید. بدین منظور تعداد ۵۵ نفر بزرگسال سالم داوطلب ۲۰-۷۰ سال انتخاب شدند (۲۳).

افراد با سابقه هر گونه بیماری سیستمیک، مصرف دارو به خصوص آنتی بیوتیک و کورتون و داروهای ضدبارداری خوارکی در بازه زمانی ۳ ماه قبل از شروع مطالعه، مصرف کنندگان عادتی محصولات پروبیوتیک و آدماس های حاوی زالبیتول و زنان باردار (۲۴) از مطالعه خارج شدند. همچنین پیش از انجام مطالعه، از عدم وجود عفونت فعال دندانی، ژنریوت و پریودنتیت در افراد اطمینان حاصل شد. با توجه به معیارهای ورود و خروج، از میان داوطلبان، 30° نفر وارد مطالعه شدند. به تمامی افراد در مورد شرایط مطالعه به صورت شفاهی توضیح داده شد و پس از مطالعه رضایت نامه آگاهانه، رضایت خود را از شرکت در مطالعه به صورت کتبی اعلام نمودند. قبل از اولین نمونه گیری، به مدت ۲ هفته به افراد شرکت کننده، مسوک و خمیر دندان و نخ دندان مشابه داده شد و ضمن آموزش بهداشت، از این افراد درخواست شد که



نمودار ۲. مقایسه میانگین شمارش S.M در هر میلی لیتر بzac افراد الكلی و غیرالكلی پس از مصرف کیک معمولی و کیک پروپویوتیک در مقایسه با Baseline

بحث و نتیجه گیری

نتایج مطالعه نشان داد که افزوندن باکتری پروپویوتیک باسیلوس کواگولانس به کیک در کوتاه مدت (یک هفته)، باعث افزایش معنی دار شمارش S.M در بzac نمی شود در حالی که مصرف کوتاه مدت (یک هفته) کیک معمولی، باعث افزایش قابل توجه شمارش S.M موجود در بzac می شود. همچنین مقایسه این دو گروه (صرف کنندگان کیک پروپویوتیک و صرف کنندگان کیک معمولی) نشان داد بین این دو گروه تفاوت آماری معنی داری وجود دارد و مصرف کیک معمولی نسبت به کیک پروپویوتیک، شمارش بzac را به شدت افزایش خواهد داد. در تعدادی از مطالعات، مصرف محصولات لبنی حاوی انواع باکتری های پروپویوتیک باعث کاهش شمارش S.M شده است (۲۸-۳۰ و ۲۵). همچنین استفاده از قرص مکیدنی حاوی باکتری پروپویوتیک لاکتوباسیل باعث کاهش قابل توجه شمارش S.M شده است (۳۱) که این نتایج همso با نتایج مطالعه حاضر می باشد. تفاوت این مطالعات با مطالعه حاضر، استفاده از محصولات لبنی به عنوان حامل باکتری های پروپویوتیک و نوع باکتری های پروپویوتیک می باشد.

در برخی مطالعات مصرف محصولات حاوی باکتری های پروپویوتیک مانند شیر، ماست و قرص های مکیدنی خوراکی، باعث کاهش قابل توجه شمارش S.M نشده است (۳۲ و ۳۳). این تفاوت ناشی از تفاوت در مدت زمان مصرف ترکیبات حاوی باکتری های پروپویوتیک، محیط کشت باکتری ها و ماده غذایی حاوی باکتری پروپویوتیک، طراحی مطالعه، سن و جنس افراد مورد بررسی، نحوه مقایسه و انتخاب strain specific پروپویوتیک ها می باشد.

در مطالعه حاضر نتایج شمارش باکتری Baseline در افراد سیگاری و افراد غیرسیگاری تفاوت معنی داری نداشت. این یافته با یافته های حاصل از برخی مطالعات که مصرف تنبک های موجب تفاوت معنی داری در شمارش استرپتوكوک های موتانس بzac نمی شود (۳۴ و ۳۵) همخوانی دارد، اگرچه مطالعاتی وجود دارد که ادعا می نمایند مصرف تنبک های آزمایشگاهی انجام شده است (۳۶ و ۳۷)؛ برخلاف این مطالعات بر روی نمونه های آزمایشگاهی انجام شده است (۳۶ و ۳۷)؛ برخلاف Sheth همانند مطالعه حاضر بر روی نمونه انسانی انجام گرفته است. مصرف کیک معمولی در افراد سیگاری نسبت به افراد غیرسیگاری با افزایش بیشتری در شمارش استرپتوكوک های موتانس همراه بود. در افراد سیگاری و

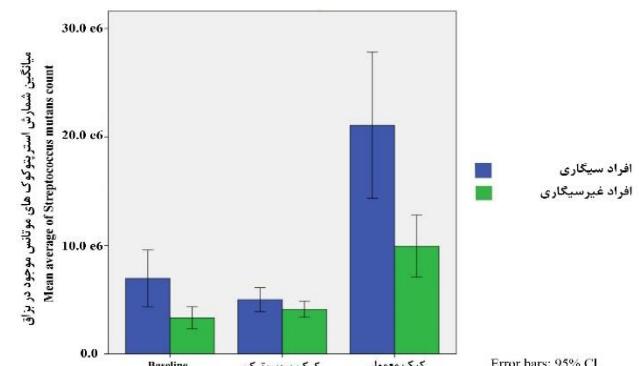
استرپتوكوک های موتانس قبل و بعد از مصرف کیک پروپویوتیک و کیک معمولی از آزمون paired T-Test استفاده شد و $p < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

از بین ۳۰ فرد مورد بررسی، ۱۶ نفر (۵۳/۳۳٪) مرد و ۱۴ نفر (۴۶/۶۷٪) زن با میانگین سنی $17/15 \pm 40/86$ سال سال بودند. حداقل سن افراد شرکت کننده، ۲۰ سال و حداکثر سن آنها ۸۶ سال بود. تعداد افراد سیگاری شرکت کننده در مطالعه، ۱۶ نفر و تعداد افرادی که مصرف الكل داشتند، ۱۱ نفر بود. میزان باکتری پس از مصرف کیک معمولی نسبت به قبل از مصرف کیک به طور معنی داری افزایش یافت ($p = 0.021$). میزان بسیار کمی افزایش یافت به طوری که این میزان افزایش، از لحاظ آماری معنی دار نبود. بین میانگین میزان S.M بعد از مصرف کیک پروپویوتیک در مقایسه با کیک معمولی، تفاوت آماری معنی داری وجود داشت ($p = 0.032$) به طوری که میزان S.M بعد از مصرف کیک معمولی نسبت به کیک پروپویوتیک، افزایش قابل توجهی را نشان داد(جدول ۱). بررسی ها نشان داد که شمارش باکتری ها در افراد سیگاری و افراد غیرسیگاری تفاوت چندانی ندارد (نمودار ۱). همچنین مصرف کیک معمولی در افراد الكلی، میزان شمارش باکتری ها را افزایش خواهد داد. مشابه افراد سیگاری، در افراد الكلی نیز با مصرف کیک معمولی نسبت به کیک پروپویوتیک، شمارش باکتری به شدت افزایش می باید (نمودار ۲).

جدول ۱. میانگین شمارش استرپتوكوک موتانس بzac و نتایج اندازه گیری pH بzac

نحوه مصرف استرپتوكوک	pH	متغیر
موتانس بzac	(*10 ⁶)(CFU/ml)	
Baseline	۷/۱۲۵±۰/۵۶۳	
پس از مصرف کیک پروپویوتیک	۶/۹۱۰±۰/۴۴۱	
پس از مصرف کیک معمولی	۶/۷۰۰±۰/۶۴۰	
جمع	۶/۹۰۸±۰/۵۴۸	



نمودار ۳. مقایسه میانگین شمارش S.M بzac افراد سیگاری و غیر سیگاری پس از مصرف کیک معمولی و کیک پروپویوتیک در مقایسه با Baseline

که مصرف روزانه کیک معمولی به طور معنی داری موجب افزایش شمارش باکتری S.M بزاق می شود بنابراین اضافه کردن باکتری های پروبیوتیک به میان وعده های شیرین و پرمصرف، می تواند باعث کاهش اثرات سوء مواد غذایی بالقوه پوسیدگی زا مانند کیک ها بر سلامت دهان شود.

تقدیر و تشکر

بدینویسیله از معاونت پژوهشی دانشکده دندانپزشکی پردیس بین الملل دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران چهت حمایت مالی از این تحقیق، تشکر و قدردانی می گردد.

غیرسیگاری، با مصرف کیک پروبیوتیک، شمارش S.M بهشدت کاهش یافت. بنابراین تأثیر مصرف کیک پروبیوتیک نسبت به کیک معمولی بر شمارش S.M در افراد غیرسیگاری بیشتر بود.

شمارش استریتوکوک های موتاس Baseline در افراد الکلی، بیشتر از افراد غیرالکلی بود، اگرچه این نتیجه با نتایج یافته های Sheth و همکاران در تناقض است (۳۴) و این می تواند به واسطه نوع الكل مصرفی و تفاوت در طراحی مطالعه و همچنین وجود فاکتور استعمال دخانیات باشد. با توجه به نتایج مطالعه حاضر و گرایش افراد جامعه به مصرف میان وعده هایی مانند کیک، مصرف کیک پروبیوتیک نسبت به کیک معمولی توصیه می شود، چرا که مصرف روزانه کیک پروبیوتیک باعث افزایش معنی دار شمارش باکتری S.M بزاق نمی شود و این در حالی است

Comparison of the Effect of Short-Term Consumption of Probiotic (*Bacillus Coagulans*) and Ordinary Cake on Salivary Streptococcus Mutans

M. Koopaie (DDS, MS)*¹, S. Jahangir (DDS)², R. Bakhtiyari (MD)³

1. Department of Oral Medicine, School of Dentistry, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran

2. School of Dentistry, International Campus, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran

3. Department of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Science, Tehran, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 20(9); Sep 2018; PP: 48-54

Received: Mar 31, 2018; Revised: May 22, 2018; Accepted: June 11, 2018.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Consumption of food causes changes in oral flora. Foods that create an appropriate media for *Streptococcus mutans* and other cariogenic microflora, cause increase the rate of tooth caries. The aim of this study was the assessment of short-term consumption of probiotic cake (contain *Bacillus coagulans*) on salivary streptococcus mutans count and comparison with ordinary cake.

METHODS: A cross over blind study was conducted on 30 healthy adult volunteers in two groups (16 males and 14 females). The first group ate probiotic cake (75 grams daily) for 1 week and after 2 weeks wash out period, they ate ordinary cake. The second group first ate ordinary cake and after 2 weeks wash out period, they ate probiotic cake (75 grams daily). Non-stimulating salivary samples, before (as baseline) and after eating probiotic and ordinary cake, were collected. Then counting of streptococcus mutans was done with colony counter.

FINDINGS: Of the 30 patients, 16 (53.33%) were male and 14 (46.67%) were female with an average age of 40.86 ± 17.15 years. Number of *Streptococcus mutans* in baseline saliva samples was $(7.872 \pm 1.430) \times 10^6$ CFU/ml and in the saliva samples after consumption of probiotic cake was $(4.652 \pm 0.841) \times 10^6$ CFU/ml and in saliva samples after consumption of ordinary cake was $(21.386 \pm 3.895) \times 10^6$ CFU/ml. There was no significantly difference between mutants count before and after eating probiotic cake ($p=0.769$) but after consumption of ordinary cake than probiotic cake the count of streptococcus increased significantly (21.3 ± 39.9 compared with 4.65 ± 0.84) ($p=0.032$).

CONCLUSION: Based on the results of this study, the addition of probiotic bacteria to sweet and high-consumption foods can reduce the adverse effects of foods such as cakes on oral health.

KEY WORDS: *Saliva, Bacillus Coagulans, Streptococcus Mutans, Probiotics.*

Please cite this article as follows:

Koopaie M, Jahangir S, Bakhtiyari R. Comparison of the Effect of Short-Term Consumption of Probiotic (*Bacillus Coagulans*) and Ordinary Cake on Salivary Streptococcus Mutans. J Babol Univ Med Sci. 2018;20(9):48-54.

*Corresponding Author: M. Koopaie (DMD, MS)

Address: Department of Oral Medicine, School of Dentistry, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran

Tel: +98 21 88351150

E-mail: m-koopaie@tums.ac.ir

References

- 1.Flichy-Fernández A-J, Alegre-Domingo T, Peñarrocha-Oltra D, Peñarrocha-Diago M. Probiotic treatment in the oral cavity: An update. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2010;15(5):e677-80.
- 2.Glanville J, King S, Guarner F, Hill C, Sanders ME. A review of the systematic review process and its applicability for use in evaluating evidence for health claims on probiotic foods in the European Union. *Nutr J.* 2015;14(1):16.
- 3.Khalesi S, Bellissimo N, Vandelanotte C, Williams S, Stanley D, Irwin C. A review of probiotic supplementation in healthy adults: helpful or hype? *Eur J Clin Nutr.* 2018;1.
- 4.Seminario-Amez M, López-López J, Estrugo-Devesa A, Ayuso-Montero R, Jané-Salas E. Probiotics and oral health: A systematic review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2017;22(3):e282.
- 5.Baker JL, Bor B, Agnello M, Shi W, He X. Ecology of the oral microbiome: beyond bacteria. *Trends Microbiol.* 2017; 25(5):362-74.
- 6.Kato I, Vasquez A, Moyenbrailean G, Land S, Djuric Z, Sun J, et al. Nutritional Correlates of Human Oral Microbiome. *J Am Coll Nutr.* 2017;36(2):88-98.
- 7.Ghazal TS, Levy SM, Childers NK, Carter KD, Caplan DJ, Warren JJ, et al. Mutans Streptococci and Dental Caries: A New Statistical Modeling Approach. *Caries Res.* 2018;52(3):246-52.
- 8.Edelstein BL, Ureles SD, Smaldone A. Very high salivary streptococcus mutans predicts caries progression in young children. *Pediatr Dent.* 2016;38(4):325-30.
- 9.Schwendicke F, Korte F, Dörfer CE, Kneist S, El-Sayed KF, Paris S. Inhibition of Streptococcus mutans Growth and Biofilm Formation by Probiotics in vitro. *Caries Res.* 2017;51(2):87-95.
- 10.Coqueiro AY, Bonvini A, Raizel R, Tirapegui J, Rogero MM. Probiotic supplementation in dental caries: is it possible to replace conventional treatment? *Nutrire.* 2018;43(1):6.
- 11.Lin TH, Lin CH, Pan TM. The implication of probiotics in the prevention of dental caries. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2018;102(2):577-86.
- 12.Hasslöf P, Hedberg M, Twetman S, Stecksén-Blicks C. Growth inhibition of oral mutans streptococci and candida by commercial probiotic lactobacilli-an in vitro study. *BMC Oral Health.* 2010;10(1):18.
- 13.Keller MK, Hasslöf P, Stecksén-Blicks C, Twetman S. Co-aggregation and growth inhibition of probiotic lactobacilli and clinical isolates of mutans streptococci: an in vitro study. *Acta Odontol Scand.* 2011;69(5):263-8.
- 14.Jurenka JS. *Bacillus coagulans.* *Altern Med Rev.* 2012;17:76-81.
- 15.Bahmani F, Tajadadi-Ebrahimi M, Kolahdooz F, Mazouchi M, Hadaegh H, Jamal AS, et al. The consumption of symbiotic bread containing Lactobacillus sporogenes and inulin affects nitric oxide and malondialdehyde in patients with type 2 diabetes mellitus: randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Am Coll Nutr.* 2016;35(6):506-13.
- 16.Cutting SM. *Bacillus probiotics.* *Food Microbiol.* 2011;28(2):214-20.
- 17.Salvetti E, Orrù L, Capozzi V, Martina A, Lamontanara A, Keller D, et al. Integrate genome-based assessment of safety for probiotic strains: *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086 as a case study. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2016;100(10):4595-605.
- 18.Riazi S, Wirawan R, Badmaev V, Chikindas M. Characterization of lactosporin, a novel antimicrobial protein produced by *Bacillus coagulans* ATCC 7050. *J Appl Microbiol.* 2009;106(4):1370-7.
- 19.Jäger R, Purpura M, Farmer S, Cash HA, Keller D. Probiotic *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086 Improves Protein Absorption and Utilization. *Probiotics Antimicrob Proteins.* 2017;1-5.
- 20.Faust K, Sathirapongsasuti JF, Izard J, Segata N, Gevers D, Raes J, et al. Microbial co-occurrence relationships in the human microbiome. *PLoS Comput Biol.* 2012;8(7):e1002606.
- 21.Jensen GS, Cash HA, Farmer S, Keller D. Inactivated probiotic *Bacillus coagulans* GBI-30 induces complex immune activating, anti-inflammatory, and regenerative markers in vitro. *J Inflamm Res.* 2017;10:107-17.
- 22.Hedberg M, Hasslöf P, Sjöström I, Twetman S, Stecksén-Blicks C. Sugar fermentation in probiotic bacteria—an in vitro study. *Oral Microbiol Immunol.* 2008;23(6):482-5.

- 23.Petersen PE. Challenges to improvement of oral health in the 21st century-the approach of the WHO Global Oral Health Programme. *Int Dent J.* 2004;54(S6):329-43.
- 24.Çaglar 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(1):35-9.
- 25.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(4):407-11.
- 26.Chong ES. A potential role of probiotics in colorectal cancer prevention: review of possible mechanisms of action. *World J Microbiol Biotechnol.* 2014;30(2):351-74.
- 27.Könönen E, Paju S, Pussinen PJ, Hyvönen M, Di Tella P, Suominen-Taipale L, et al. Population-based study of salivary carriage of periodontal pathogens in adults. *J Clin Microbiol.* 2007;45(8):2446-51.
- 28.Siddiqui M, Singh C, Masih U, Chaudhry K, Hegde DY, Gojanur S. Evaluation of Streptococcus mutans Levels in Saliva before and after Consumption of Probiotic Milk: A Clinical Study. *J Int Oral Health.* 2016;8(2):195-8.
- 29.Javid AZ, Ardekani MTF, Basir L, Ekrami A, Motamedifar M, Haghigizadeh MH, et al. Effect of curcumin on acidogenicity, viable bacteria and biomass in experimental biofilm model on human tooth. *Int J Adv Biotechnol Res.* 2017;8(1):77-82.
- 30.Ritthagol W, Saetang C, Teanpaisan R. Effect of probiotics containing Lactobacillus paracasei SD1 on salivary Mutans Streptococci and Lactobacilli in orthodontic cleft patients: A double-blinded, randomized, placebo-controlled study. *Cleft Palate-Craniofac J.* 2014;51(3):257-63.
- 31.Caglar E, Cildir SK, Egereli 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(5):314-8.
- 32.Chuang LC, Huang C-S, Ou-Yang LW, Lin SY. Probiotic Lactobacillus paracasei effect on cariogenic bacterial flora. *Clin Oral Investig.* 2011;15(4):471-6.
- 33.Keller M, Hasslöf P, Dahlén G, Stecksén-Blicks C, Twetman S. Probiotic supplements (Lactobacillus reuteri DSM 17938 and ATCC PTA 5289) do not affect regrowth of mutans streptococci after full-mouth disinfection with chlorhexidine: a randomized controlled multicenter trial. *Caries Res.* 2012;46(2):140-6.
- 34.Sheth CC, Makda K, Dilmahomed Z, González R, Luzi A, Jovani-Sancho MdM, et al. Alcohol and tobacco consumption affect the oral carriage of Candida albicans and mutans streptococci. *Lett Appl Microbiol.* 2016;63(4):254-9.
- 35.Voelker MA, Simmer-Beck M, Cole M, Keeven E, Tira D. Preliminary findings on the correlation of saliva pH, buffering capacity, flow, consistency and Streptococcus mutans in relation to cigarette smoking. *Am Dent Hyg.* 2013;87(1):30-7.
- 36.Li M, Huang R, Zhou X, Zhang K, Zheng X, Gregory RL. Effect of nicotine on dual-species biofilms of Streptococcus mutans and Streptococcus sanguinis. *FEMS Microbiol Lett.* 2014;350(2):125-32.
- 37.Li M, Huang R, Zhou X, Qiu W, Xu X, Gregory RL. Effect of nicotine on cariogenic virulence of Streptococcus mutans. *Folia Microbiol (Praha).* 2016;61(6):505-12.