

# Candida Albicans'ın Diştaşı Oluşumundaki Rolünün *In Vitro* Olarak İncelenmesi

Fatih Karaaslan(0000-0002-9899-3316)<sup>α</sup>, Turgut Demir(0000-0002-4107-8766)<sup>β</sup>, Özlem Barış(0000-0002-2679-5599)<sup>γ</sup>

*Selcuk Dent J*, 2021; 8: 600-604 (Doi: 10.15311/selcukdentj.636894)

Başvuru Tarihi: 07 Eylül 2019  
Yayına Kabul Tarihi: 28 Eylül 2020

### ÖZ

#### Candida Albicans'ın Diştaşı Oluşumundaki Rolünün *In Vitro* Olarak İncelenmesi

**Amaç:** Bu çalışmanın amacı; periodontal hastalığın patogenezindeki rolü tam olarak bilinmemekle birlikte bir çok araştırmada periodontal olarak hastalıklı bireylerde varlığı tesbit edilen *Candida albicans* (*C. albicans*)'ın diştaşı oluşumunda rol alıp almadığının *in vitro* ortamda araştırılmasıdır.

**Gereç ve Yöntemler:** *C. albicans* suşlarının canlandırılması ve inkübasyonu için Sabouraud-2 % Dextrose Agar (SDA) besiyeri kullanıldı. Kalsifikasyon çalışmaları için katı (B-2, B-4, modifiye), sıvı besiyeri ve Mineral Salt Basal Uygulama Tamponu (MSB) hazırlandı. Kalsifikasyon yapıp yapmadığı ışık mikroskobu ve spektrofotometre ile incelendi.

**Bulgular:** *C. albicans* B-2, B-4 ve sıvı besiyerlerinde kalsifikasyon oluştururken, MSB de herhangi bir kalsifikasyon oluşumu izlenmedi.

**Sonuç:** *C. albicans*'ın *in vitro* diştaşı oluşumuna katıldığı belirlendi. İlgili mikroorganizmanın diştaşı oluşumunda rol olarak periodontal hastalığın ortaya çıkmasına katkı sağladığı söylenebilir.

### ANAHTAR KELİMELELER

Diştaşı, Kalsifikasyon, *Candida albicans*, Periodontal hastalıklar

### ABSTRACT

#### *In Vitro* Investigation of The Role of *Candida Albicans* In Dental Calculus Formation

**Background:** The aim of this study is to investigate the role of *Candida albicans* (*C. albicans*) which is detected in periodontally diseased individuals in dental calculus formation.

**Methods:** Sabouraud-2% Dextrose Agar (SDA) medium was used for the growth and incubation of *C. albicans*. Solid (B-2, B-4, modified), liquid medium and Mineral Salt Basal Application Buffer (MSB) were prepared for calcification studies. Calcification was examined by light microscopy and spectrophotometer.

**Results:** Although calcification was determined in B-2, B-4 and liquid medium, no calcification was observed in MSB.

**Conclusion:** *C. albicans* was found to be involved in the *in vitro* formation of dental calculus. It can be said that *C. albicans* can contribute to the initiation of periodontal diseases by taking part in the formation of dental calculus.

### KEYWORDS

Dental calculus, Calcification, *Candida albicans*, Periodontal diseases

Periodontal hastalığın başlaması ve ilerlemesinde primer etyolojik faktör dental plaktır. Dental plağın mineralize olarak kalsifiye depozit şekline dönüşmesiyle diştaşı meydana gelmektedir.<sup>1</sup> Diştaşlarının yüzeyi metabolik olarak aktif mikroorganizma katmanı ile kaplıdır ve yapısında bulunan non-mineralize alanlar bakterilerin virülans faktörlerinin dışarıya salınımına olanak sağlamaktadır.<sup>2,3</sup> Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda diştaşı ile periodontal hastalık arasında güçlü bir korelasyon olduğu belirtilmiştir.<sup>4,5</sup>

Dental plağın mineralizasyonunda kalsiyum iyonlarının depozisyonu ve kristalleşme için gerekli fiziksel şartların bakteriler tarafından oluşturulduğu düşünülmektedir. Friskopp ve Hammarstrom kalsifikasyonun filamentöz bakteriler arasında başladığını ve filamentöz bakterilerin kalsifikasyon için uygun bir intermikrobiyal alan oluşturarak diştaşı oluşumunu desteklediğini belirtmişlerdir.<sup>6</sup>

*Candida albicans* (*C. albicans*) hem sağlıklı hemde sistemik olarak hastalıklı bireylerin oral florasında bulunan ve birçok hastalığa neden olan fırsatçı bir mikroorganizmadır.<sup>7</sup> *C. albicans*'ın periodontal hastalığın patogenezindeki rolü tam olarak bilinmemekle birlikte birçok araştırmada periodontal olarak hastalıklı bireylerde varlığı tesbit edilmiştir.<sup>8-10</sup> Yapılan çalışmalarda periodontal cep bölgesinde *C. albicans* varlığını saptanmış ve kemik ve ataşman kaybı bulunan bireylerin dişeti dokusunda *C. albicans* varlığı belirtilmiştir.<sup>11,12</sup>

Diştaşı oluşumunda bakterilerin etkileri araştırılmış olmasına rağmen kesin ve açıklayıcı bilgilere ulaşılamamaktadır. Özellikle diştaşı oluşumuna katılan ve diştaşı içerisinde bulunan bakterilerin kalsifikasyon mekanizmasında görev yapmadıkları bilinmemektedir. *C. albicans*'ın diş sert dokularına bağlanarak biyofilm tabakası

<sup>α</sup> Uşak Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji AD, Uşak, Türkiye

<sup>β</sup> Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji AD, Erzurum, Türkiye

<sup>γ</sup> Atatürk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Erzurum, Türkiye

oluşumundaki rolü ile ilgili herhangi bir çalışma mevcut değildir. Bu bağlamda çalışmanın amacı *C. albicans*'ın *in vitro* ortamda kalsifikasyon oluşumuna katılıp katılmadığının belirlenmesidir.

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmada kullanılan *C. albicans* suşları uluslararası kültür koleksiyonu olan ATCC (The American Type Culture Collection-Georgetown University, Bacteria Department, Washington, U.S.A)'den temin edildi. *C. albicans*'ın aksesyon kodu ATCC 10231 idi. *C. albicans*'ın canlandırılması ve inkübasyonu için Sabouraud-2% Dextrose Agar (SDA) besiyeri hazırlandı.

### SDA besiyerinin hazırlanması

250 ml besiyeri için; 2,5 g special peptone, 5 g glukoz, 4 g agar steril su içerisine ilave edildi. Besiyeri otoklavda 121°C'de 20 dk steril edildi. 45-50°C'ye kadar soğutulduktan sonra steril petrilere dökülerek katılaşmaya bırakıldı. Besiyerleri günlük ve taze olarak hazırlandı ve ekim işlemi yapıncaya kadar oda ısısında muhafaza edildi.

### Canlandırma ve inkübasyon

ATCC'den ticari olarak temin edilen liyofilize *C. albicans* suşları üzerine steril serum fizyolojik eklenerek süspansiyon edildi. Steril pipet kullanılarak süspansiyon haldeki *C. albicans* suşu besiyerine aktarıldı. Aerobik şartlar altında 37°C 48 saat etüvde inkübasyon işlemi yapıldı. Inkübasyon sonrası besiyerinde oluşan koloniler incelendi. Gelişen kolonilerden bir öze dolusu kültür alındı. Besiyerini içeren petri kabına birkaç mm çapında yayma işlemi yapıldı. Daha sonra bu öze aracılığıyla yayılma alanından başlayarak çizgi ekimine geçildi. Çizgi ekimi birbirini 90 derece açıyla kesen bölgeler oluşturacak şekilde yapıldı. Ekim yapılmış petri kabı aerobik şartlar altında etüvde 37°C'de 48 saat inkübe edildi. Canlandırma ve gelişmesi sağlanan *C. albicans* mineralizasyon denemeleri yapıncaya kadar %15-18 gliserol içeren ortamda -78°C de muhafaza edildi.

Canlandırılıp inkübasyonu yapılan *C. albicans*'ın katı ve sıvı besiyerlerine ekimi ile mineral salt basal tamponu (MSB) içerisine uygulaması yapıldı.

### Katı Besiyerine Ekim

Hazırlanan mikroorganizmaların her biri B-4, B-2 ve standart besiyerlerinin modifiye edilmesi ile oluşan katı besiyerlerine ekimi yapıldı. Modifiye besiyeri standart besiyerlerinin 3/4' lük kısmına %0,15-%0,25 oranında kalsiyum asetat katılarak oluşturuldu. Inkübasyonun 3.,

5., 7., 14., 28. ve 40. günlerinde petri plaklarında kristal oluşumu ışık mikroskobu (LM) altında tesbit edildi.

B-4 besiyeri hazırlanışı; 0,25 g kalsiyum asetat, 0,4 g maya özütü, 1 g glukoz ve 1,8 g agar karışımı 100 ml saf su içerisine ilave edildi. pH 7.2' ye ayarlandı ve besiyeri otoklavda steril edildi. 45-50°C'ye kadar soğutulduktan sonra steril petrilere dökülerek katılaşmaya bırakıldı.<sup>13</sup>

B-2 besiyeri hazırlanışı; 2 g kazein, 0,5 g glukoz, 6 g tris, 0,5 g maya özütü, 0,75 g kalsiyum asetat ve 7,5 g agar karışımı 500 ml saf su içerisine ilave edildi. pH 7.4'e ayarlandı ve besiyeri otoklavda steril edildi. 45-50°C'ye kadar soğutulduktan sonra steril petrilere dökülerek katılaşmaya bırakıldı.<sup>14</sup>

### Sıvı Besiyerine Ekim

Sıvı besiyeri B-2 besiyerine agarın katılmaması sonucu elde edildi. Besiyeri hazırlandıktan sonra otoklavda steril edildi ve plastik erlene aktarıldı. Sıvı besiyerine ekimden sonra inkübasyonun 10., 20. ve 40. günlerinde sıvı besiyerinden steril pipetler aracılığıyla alınan örnekler lam üzerine yayıldı ve LM altında incelendi.

### Mineral Salt Basal Uygulama Tamponu

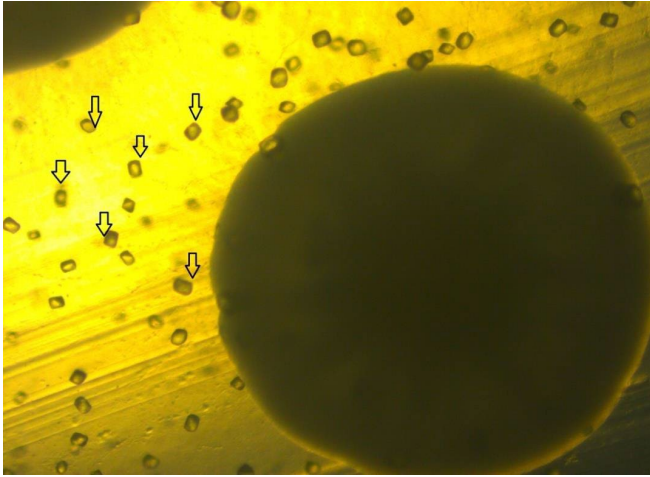
1 litre saf su içerisine 0,75 g dipotasyum fosfat, 0,2 g monopotasyum fosfat ve 0,09 g magnezyum sülfat ilave edilmesiyle MSB oluşturuldu.<sup>15</sup> Bu içeriğin pH'sı 7.0 olarak ayarlandı ve 0.22 µm'lik filtreler aracılığıyla steril edildi.

Hazırlanan MSB içeriğinden 9 ml alındı ve içerisine *C. albicans* McFarland Standard I referans alınarak ilave edildi ve süspansiyon oluşturuldu. Hazırlanan süspansiyona hacim 10 ml olacak şekilde tekrar MSB içeriği ilave edildi. Hazırlanan içeriğe stok solusyonundan otomatik pipetler aracılığıyla damla damla 140 g/l kalsiyum klorür (CaCl<sub>2</sub>) toplam hacim 12 ml olana kadar ilave edildi. Damla damla ilave esnasında çökelme olup olmadığı gözlemlendi ve kesin sonuçlar için 24 saat beklendi. Kontrol grubu oluşturmak amacıyla 10 ml MSB içeriğine herhangi bir mikroorganizma ilave etmeden 2 ml 140 g/l CaCl<sub>2</sub> ilave edildi.

MSB içerisinde oluşan kalsifikasyonu kişisel gözlemden arındırıp sayısal değerler elde etmek için spektrofotometre kullanıldı. Spektrofotometrede 540 nanometre dalga boyunda % transmitans alındı. Transmitans olarak çözeltiliye giren ışığın yüzde kaçının çözeltiliden çıktığı gösterildi. Kontrol grubunu kör kabul ederek solusyondaki bulanıklık derecesini yani kalsifikasyon miktarları değerlendirildi.

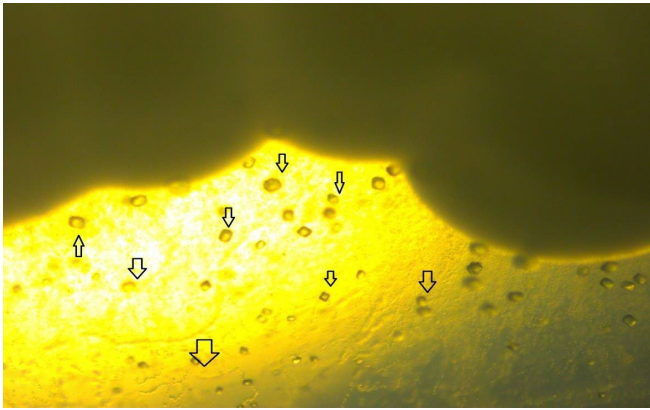
## BULGULAR

Katı besiyerine ekim bulguları; *C. albicans*'ın hem B-2 hem de B-4 besiyerlerinde kalsifikasyon oluşturduğu gözlemlendi (**Şekil 1** ve **Şekil 2**). Modifiye besiyerinde ise zenginleştirici olarak kullanılan kan ve heminden dolayı ışık mikroskobu altında herhangi bir tesbit yapılamadı.



Şekil 1

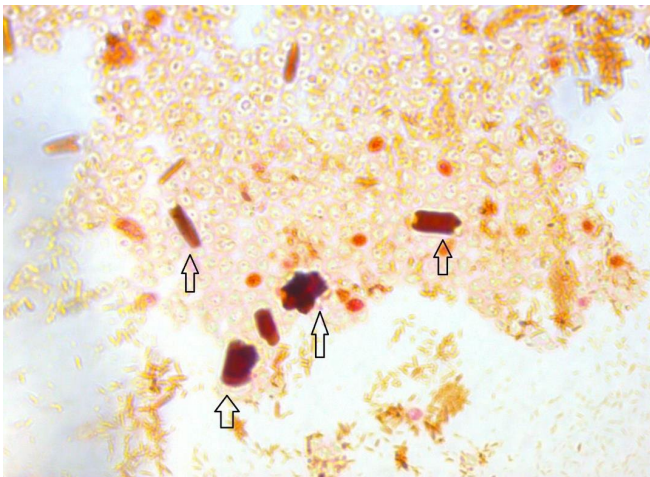
C. albicans'ın B-4 besiyerinde oluşturduğu kristal tanecikleri (40×10 LM). Kalsifikasyon odakları ok işareti ile gösterilmiştir.



Şekil 2

C. albicans'ın B-2 besiyerinde oluşturduğu kristal tanecikleri (40×10 LM). Kalsifikasyon odakları ok işareti ile gösterilmiştir

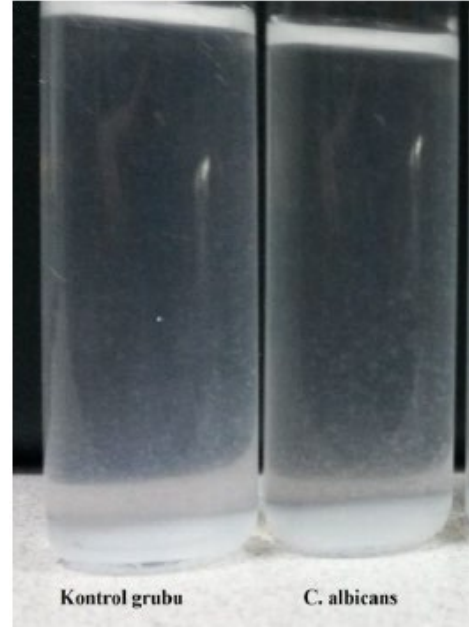
Sıvı besiyerine ekim için B-2 besiyerinin sıvı hali kullanıldı. Sıvı besiyerinde de C. albicans'ın kalsifikasyon oluşturduğu gözlemlendi (Şekil 3).



Şekil 3

C. albicans'ın sıvı besiyerinde oluşturduğu kristal tanecikleri (100×10 LM). Kalsifikasyon odakları ok işareti ile gösterilmiştir

MSB içeriğine CaCl<sub>2</sub> eklendiğinde C. albicans içeren solusyon kontrol grubuna göre mineralizasyon göstermedi (Şekil 4).



Şekil 4

C. albicans'ın sıvı besiyerinde oluşturduğu kristal tanecikleri (100×10 LM). Kalsifikasyon odakları ok işareti ile gösterilmiştir

C. albicans'ın transmittansının kontrol grubuna göre düşük olmakla birlikte anlamlı bir farklılık gözlenmedi (Tablo 1).

Tablo 1.

**Pedodontistlerin demografik ve mesleki deneyimleri**

Mikroorganizma	540nm%T
Kontrol grubu	99.9
C. albicans	98.8

Lenfadenopati'nin eşlik ettiği akut apikal apselli bir diş olan 10 yaşındaki hastanızdaki öncelikli antibiyotik seçiminiz ne olur?

Anketimize katılan pedodontistler, böyle bir durumda % 86.5'i amoksisilin + klavulanik asit kombinasyonunu tercih edeceklerini belirtmişlerdir. (Şekil 3).

### TARTIŞMA

Diştaşı formasyonu temelde dental plağın elimine edilmemesi sonucu tükürük ve dişeti oluğu sıvısı esaslı amorf materyal ve mikroorganizma içerikli organik matriks üzerine kalsiyum fosfat kristallerinin çökmesi sonucu oluşur.<sup>16</sup> Diştaşı formasyonu alkali ortam varlığında tükürükte bulunan kalsiyum ve fosfat iyonlarının çökelmeye başlaması ve mineral formunu almasıyla gerçekleşir. Bu çökme, ortamda bulunan bakterilerin alkali şartları geliştirmesiyle ve plak içerisinde var olan mineralizasyon çekirdekleriyle

bakterilerin kristalizasyon ve mineralizasyonda rol olarak dıştaşı oluşumuna katkı sağladığı ve periodontal hastalıklar için risk oluşturduğu düşünülmektedir.

Dıştaşı oluşum mekanizması üzerine yapılan çalışmalar bakterilerin rolüne dikkat çekmiş ama bu ilişkiyi tam olarak açıklayamamıştır. Bakterilerin dıştaşı oluşumuna katılıp katılmadığı yönünde yapılan çalışmalar sınırlıdır ve daha çok bakterilerin pasif katılımını göstermeye yöneliktir.<sup>18-20</sup> Bu çalışmada *C. albicans*'ın periodontal hastalık oluşumunda katkıda bulunmasının yanı sıra dıştaşı oluşumunda da rol alıp almadığı incelenmeye çalışıldı. *C. albicans* eğer dıştaşı oluşumunda rol oynuyorsa, rolünün ise aktif mi yoksa pasif mi olduğunu belirlemek için farklı besiyerleri kullanıldı. Bu doğrultuda *C. albicans*'ın aktif mineralizasyonunu tesbit etmek için katı ve sıvı besiyerlerine ekimleri yapıldı. Pasif mineralizasyonun tesbiti için ise MSB tamponu kullanıldı.

Boquet ve ark. 1973 yılında mikroorganizmalar üzerinde yapılan kalsifikasyon çalışmalarında uyguladıkları daha sonra da birçok araştırmacı tarafından da kullanılan B-4 besiyeri ve B-4 besiyerinin modifiye edilmesi ile hazırlanan B-2 besiyeri çalışmamızda kullanıldı.<sup>13,14</sup> B-4 ve B-2 besiyerlerinin yanı sıra modifiye besiyeri de oluşturuldu. Araştırmamız üç farklı katı besiyeri kullanılması yönüyle diğer tüm *in vitro* kalsifikasyon araştırmalarından üstünlük göstermektedir. Diş hekimliğinde ise bu besiyerleri kullanılarak herhangi bir kalsifikasyon araştırması yapılmamıştır.

B-2 ve B-4 besiyerlerinde kalsifikasyon odakları görülürken, modifiye besiyerinde ise herhangi bir kalsifikasyon odağı tesbit edilemedi. Bizim çalışmamızla paralellik gösteren bir çalışmada *in vitro* ortamda *C. albicans*'ın uygun koşullar altında intrasellüler kalsifikasyon yaptığı ortaya konmuştur.<sup>21</sup> Ancak bu çalışma incelendiğinde herhangi bir besiyerinden ve ekimin yapıldığı koşullardan bahsedilmemektedir. *C. albicans*'ın hem B-2 hemde B-4 besiyerlerinde kalsifikasyon göstermesi iki sebebe bağlanabilir. Bunlardan birincisi *C. albicans*'ın fizyolojik uç durumlara iyi bir uyum kapasitesine sahip olması, diğeri ise ortamda glikoz ve iki değerlikli iyon (Ca+2) varlığında biyofilm oluşturma kapasitesinin artmasıdır.<sup>22</sup> *C. albicans* zorlu şartlar altında canlılığını sürdürebilen ve biyofilm oluşturma kapasitesi yüksek bir mikroorganizmadır.<sup>23</sup> Bu bilgiler doğrultusunda *C. albicans*'ın hem kendi organik yapısının, hem de oluşturduğu biyofilm yapının minerallerin birikmesi için şablon görevi gördüğü ve kalsifikasyon oluşturduğu düşünülebilir.

*C. albicans*'ın katı besiyerinde olduğu gibi sıvı besiyerinde de kalsifikasyon oluşturduğu gözlemlendi. Bu mikroorganizmanın sıvı besiyerinde oluşturduğu kalsifikasyon odakları katı besiyerindekilerden daha küçük boyutta ve daha az miktardadır. Katı besiyerinde

mikroorganizma kolonisinden ekstrasellüler ortama diffüze olan moleküller koloniye belli bir mesafede veya koloniler arasında kristal oluşmasını teşvik etmektedir. Sıvı ortamda ise ortama salgılanan moleküller tüm sıvı içerisine dağıldığından dolayı konsantrasyon katıya nazaran daha düşük olmaktadır. Bundan dolayı kristalizasyon katı besiyerine göre biraz daha geç ve zayıf bir şekilde ortaya çıkmaktadır. Sıvı besiyerinde kristallerin daha küçük olması besiyeri içeriğine bağlanamaz çünkü her iki besiyeri içerisindeki iyon yoğunluğu açısından aynıdır. Sıvı besiyerinde, sadece besiyerinin katılaşması için gerekli olan agar kullanılmamıştır.

MSB nanopartikül sentezinde kullanılan özel bir tampondur sistemidir.<sup>24</sup> İçeriği dipotasyum fosfat ve monopotasyum fosfat kullanılarak oluşturulan bir fosfat tamponu ile magnezyum sülfattan oluşmaktadır.<sup>24</sup> MSB'yi kullanmamızın nedeni pH stabilitesi sağlayan iyi bir tampon olması ve içerisinde bulunan sülfat ve fosfatın kalsiyum ile birleşerek partikül oluşturmasıdır. Doygun kalsiyum çözeltisi oluşturmak için CaCl<sub>2</sub> kullanmamızın nedeni ise CaCl<sub>2</sub>'nin sıvı ortamda iyi çözülmesi ve Ca+2 oluşturabilmesidir. MSB içerisine ilave edilen CaCl<sub>2</sub> miktarı toplam hacmin %20'sinden fazla olmayacak şekilde yapılmasındaki ana etken doygunluğun aşırı bir şekilde artırılmayıp kendi kendine çökmesinin önüne geçmektir.

*C. albicans* katı ve sıvı besiyerinde kalsifikasyon oluşturduğu halde MSB içerisinde herhangi bir kalsifikasyon göstermedi. *C. albicans* katı ve sıvı besiyerinde herhangi bir organik moleküle tutunarak kalsifikasyon çekirdeği oluşturup kristal oluşturabildiği halde MSB içerisinde tutunabileceği bir organik molekül olmadığından kalsifikasyon oluşturamamıştır. Organik moleküle tutunma hem mikroorganizma için hem de mikroorganizmanın kalsifikasyon çekirdeği oluşturabilmesi açısından önemlidir. *C. albicans*'ın transmittansının kontrol grubuna göre düşük olmasının nedeni; kontrol solüsyonu içerisinde herhangi bir mikroorganizmanın bulunmaması, kalsifikasyon gözlenmeyen *C. albicans* solüsyonun da ise mikroorganizma varlığının solüsyona giren ışınların ufak bir kısmını tutmasından ileri gelmektedir.

## SONUÇ

*C. albicans* periodontal hastalıklı bireylerde izole edilmesine rağmen periodontal hastalıktaki rolü tam olarak bilinmemektedir. *C. albicans*'ın rolünü açıklamaya çalışan bu araştırmada *C. albicans*'ın katı ve sıvı besiyerlerinde kalsifikasyon oluşturduğu MSB içerisinde ise kalsifikasyon oluşturmadığı gözlemlendi. *C. albicans*'ın dıştaşı oluşumuna aktif olarak katılabileceği belirlendi. İlgili mikroorganizmanın dıştaşı oluşumunda aktif rol olarak periodontal hastalığın ortaya çıkışında rol oynadığı söylenebilir.

**KAYNAKLAR**

1. Akcalı A, Lang NP. Dental calculus: the calcified biofilm and its role in disease development. *Periodontology* 2000 2018; 76: 109-15.
2. Saini R. Dental calculus: A strategic review. *Int J Dent Health Sci* 2014; 1: 788-95.
3. Tan B, Gillam DG, Mordan NJ, Galgut PN. A preliminary investigation into the ultrastructure of dental calculus and associated bacteria. *J Clin Periodontol* 2004; 31: 364-9.
4. Crocombe L, Brennan D, Slade G, Loc D. Is self interdental cleaning associated with dental plaque levels, dental calculus, gingivitis and periodontal disease? *J Periodontol Res* 2012; 47: 188-97.
5. Delgado-Darias T, Velasco-Vázquez J, Arnay-De-La-Rosa M, Martin-Rodriguez E, González-Reimers E. Calculus, periodontal disease and tooth decay among the prehispanic population from Gran Canaria. *J Archaeol Sci* 2006; 33: 663-70.
6. Friskopp J, Hammarstrom LA. Comparative, scanning electron microscopic study of supragingival and subgingival calculus. *J Periodontol* 1980; 51: 553-62.
7. Dalle F, Wächtler B, L'ollivier C, et al. Cellular interactions of *Candida albicans* with human oral epithelial cells and enterocytes. *Cell Microbiol* 2010; 12: 248-71.
8. Canabarro A, Valle C, Farias M, Santos F, Lazera M, Wanke B. Association of subgingival colonization of *Candida albicans* and other yeasts with severity of chronic periodontitis. *J Periodontol Res* 2013; 48: 428-32.
9. Reynaud AH, Nygaard-Ostby B, Boygard GK, Eribe ER, Olsen I, Gjermo P. Yeasts in periodontal pockets. *J Clin Periodontol* 2001; 28:8 60-4.
10. Sardi JC, Duque C, Mariano FS, Peixoto IT, Höfling JF, Gonçalves RB. *Candida* spp. in periodontal disease: a brief review. *J Oral Sci* 2010; 52: 177-85.
11. Jarvensivu A, Hietanen J, Rautemaa R, Sorsa T, Richardson M. *Candida* yeasts in chronic periodontitis tissues and subgingival microbial biofilms in vivo. *Oral Dis* 2004; 10: 106-12.
12. Cuesta AI, Jewtuchowicz V, Brusca MI, Nastri ML, Rosa AC. Prevalence of *Staphylococcus* spp and *Candida* spp in the oral cavity and periodontal pockets of periodontal disease patients. *Acta Odontol Latinoam* 2010; 23: 20-6.
13. Boquet E, Boronat, A, Ramos-Cormenzana, A. Production of Calcite (Calcium Carbonate) Crystals by Soil Bacteria is a General Phenomenon. *Nature* 1973; 246:527-9.
14. Barış Ö. Erzurum ilindeki mağaralarda damlataşı oluşumunda etkili bakterilerin izolasyonu, karakterizasyonu ve tanısı. [Tez]. Erzurum: Atatürk Üniversitesi; 2009.
15. Ho AM, Johnson MD, Kingsley DM. Role of the mouse ank gene in control of tissue calcification and arthritis. *Science* 2000; 289:265-70.
16. Abraham J, Grenon M, Sanchez HJ, Perez C, Barrea R. A case study of elemental and structural composition of dental calculus during several stages of maturation using SRXRF. *J Biomed Mater Res A* 2005; 75: 623-8.
17. Abraham J, Grenon M, Sanchez HJ, Perez CA, Barrea RA. Spectrochemical analysis of dental calculus by synchrotron radiation X-ray fluorescence. *Anal Chem* 2002; 74: 324-9.
18. Moolya NN, Thakur S, Ravindra S, Setty SB, Kulkarni R, Hallikeri K. Viability of bacteria in dental calculus—A microbiological study. *J Indian Soc Periodontol* 2010; 14: 222-6.
19. Gupta S, Jain P, Kumra M, et al. Bacterial viability within dental calculus: An untrodden, inquisitive clinico-patho-microbiological research. *J Clin Diagn Res* 2016; 10: 71-5.
20. Baskar S, Baskar R, Mauclarie L, McKenzie JA. Microbially induced calcite precipitation in culture experiments: Possible origin for stalactites in Shastradhara caves, Dehradun, India. *Curr Sci* 2006; 92:350-5.
21. Ennever J, Summers FE. Calcification by *Candida albicans*. *J Bacteriol* 1975; 122: 1391-3.
22. Kim J, Sudbery P. *Candida albicans*, a major human fungal pathogen. *J Microbiol* 2011; 49: 171-7.
23. Gow NA, Van De Veerdonk FL, Brown AJ, Netea MG. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nat Rev Microbiol* 2012; 10: 112-22.
24. Kundu D, Hazra C, Chatterjee A, Chaudhari A, Mishra S. Extracellular biosynthesis of zinc oxide nanoparticles using *Rhodococcus pyridinivorans* NT2: Multifunctional textile finishing, biosafety evaluation and in vitro drug delivery in colon carcinoma. *J Photochem Photobiol B* 2014; 140:194-204.

**Yazışma Adresi:**

Fatih KARAASLAN  
 Uşak Üniversitesi  
 Diş Hekimliği Fakültesi  
 Periodontoloji AD  
 Uşak, Türkiye  
 Tel : +90 553 872 17 83  
 E Posta: fatih.karaaslan@usak.edu.tr