مقاله اصیل پژوهشی

مجله دانشکده
دندانپزشکی اصفهان
۱۳۹۵: ۱۲(۳): ۲۳۲ تا ۲۴۷

بررسی اثر عسل، سرکه و گلاب بر چسبندگی و تشکیل بیوفیلم استرپتوکوک‌های موتانس و سوبرینوس

نیره جبالی [۱]
محمد ربانی خوراسگانی [۲]
مهرناز کیهان‌فر [۳]
حمید امامی [۴]

۱: کارشناس ارشد بیوتکنولوژی میکروبی، گروه زیست‌فناوری، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران.
۲: **نویسنده مسؤول:** دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران.
Email: m.rabbani@biol.ui.ac.ir
۳: دانشیار گروه زیست‌فناوری، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران.
۴: مربی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران.

چکیده

مقدمه: شواهد نشان دهنده نقش استرپتوکوک‌های گروه موتانس و لاکتوباسیل‌ها در شروع و پیشرفت پوسیدگی دندان می‌باشد. هدف از مطالعه حاضر، بررسی اثر برخی ترکیبات طبیعی بر تشکیل بیوفیلم توسط عوامل مسبب پوسیدگی و مقایسه اثر آن با سه دهان‌شویه گیاهی بود.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش آزمایشگاهی، از ترکیبات طبیعی (سرکه، گلاب و عسل) و دو سویه استرپتوکوکوس (استرپتوکوکوس موتانس و استرپتوکوکوس سوبرینوس) استفاده شد. ابتدا میزان چسبندگی و قدرت تشکیل بیوفیلم سویه‌های پاتوژن و در مرحله بعد اثر این ترکیبات بر قدرت تشکیل و حذف بیوفیلم مورد بررسی قرار گرفت. در هر دو آزمایش از روش میکروتیترپلیت استفاده شد. همچنین اثر مهاری این ترکیبات بر رشد استرپتوکوک‌ها بررسی شد. در نهایت اثر این ترکیبات با سه دهان‌شویه گیاهی مقایسه شد. داده‌ها توسط نرم افزارهای SPSS نسخه ۱۵ (version 15, SPSS Inc., Chicago, IL) (با استفاده از روش آزمون میانگین دو جامعه مستقل) و Excel در سطح اطمینان (p value < ۰/۰۵) مورد تحلیل آماری قرار گرفت.

یافته‌ها: استرپتوکوکوس موتانس چسبندگی قوی (جذب نوری ۲/۵) و استرپتوکوکوس سوبرینوس چسبندگی متوسط (جذب نوری ۱/۵۳) داشت. سرکه، گلاب و عسل به ترتیب به میزان ۶۶/۴۵، ۶۶/۱۸ و ۶۶/۴۳ درصد، باعث کاهش تشکیل بیوفیلم توسط استرپتوکوکوس موتانس شد. مقایسه اثر ترکیبات طبیعی و دهان‌شویه‌های گیاهی نشان داد که سه دهان‌شویه اختلاف معنی‌داری را در کاهش اتصال عوامل بیماری‌زا نداشتند (p value > ۰/۰۵). گلاب، نسبت به موارد ذکر شده اثر کمتری در کاهش اتصال عوامل بیماری‌زا نشان داد. نتایج حاکی از اثر مهاری سرکه و سه دهان‌شویه بر رشد استرپتوکوک‌ها بود.

نتیجه‌گیری: این ترکیبات طبیعی به ویژه سرکه و در مرحله بعد عسل توانایی کاهش قدرت تشکیل بیوفیلم توسط سویه‌های پاتوژن را دارند. در نتیجه استفاده از این ترکیبات از طریق کاهش اتصال استرپتوکوک‌ها می‌تواند در پیشگیری و کنترل پوسیدگی‌دندان مؤثر باشد.

کلید واژه‌ها: پوسیدگی دندان، استرپتوکوکوس موتانس، استرپتوکوکوس سوبرینوس، ترکیبات بیولوژیک، دهان‌شویه گیاهی.

تاریخ ارسال: ۹۵/۱/۲۰ تاریخ اصلاح: ۹۵/۶/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۵/۶/۱۶

استناد به مقاله: جبالی ن، ربانی خوراسگانی م، کیهان‌فر م، امامی ح: بررسی اثر عسل، سرکه و گلاب بر چسبندگی و تشکیل بیوفیلم استرپتوکوک‌های موتانس و سوبرینوس. مجله دانشکده دندانپزشکی اصفهان، ۱۳۹۵، ۱۲(۳)، ۲۳۲-۲۴۷.

مقدمه

حفره دهان، یک محیط مرطوب با درجه حرارت نسبتاً ثابت (۳۴ تا ۳۶ درجه سانتی‌گراد) و pH نزدیک به خنثی در بسیاری از مناطق می‌باشد و رشد طیف گسترده‌ای از ریزسازواره‌ها (Microorganisms) را باعث می‌شود. در حفره دهان زیستگاه‌های متعددی وجود دارد که باعث رشد جوامع میکروبی مختلف می‌شود (۱). پوسیدگی دندان (Dental caries) و بیماری‌های پریودنتال (Periodontal diseases) دو بیماری عفونی شایع در بین بیماری‌های دهانی انسان‌ها می‌باشد. این شرایط به علت تشکیل پلاک دندانی که توسط باکتری‌ها و مخمرها که در حفره دهانی حضور دارند، ایجاد می‌شود (۲).

در حال حاضر به خوبی ثابت شده که پوسیدگی دندان و بیماری‌های پریودنتال در ارتباط با ریزسازواره‌های مقیم در پلاک دندانی هستند (۱)، با این که نقش باکتری‌ها در ایجاد ضایعات پوسیدگی به خوبی روشن شده، اما برقراری نوعی رابطه علت و معلولی بین سازواره‌های فلور میکروبی دهان با پوسیدگی موفق نبوده است. ارزیابی نقش یک گونه خاص در روند بیماری و در ارتباط با جامعه پیچیده پلاک، کار بسیار دشوار در سیستم آزمایش‌های بالینی است (۳). با این حال شواهد قابل توجهی وجود دارد که نشان‌دهنده نقش استرپتوکوک‌های گروه موتانس (به خصوص استرپتوکوکس موتانس (*Streptococcus mutans*) و استرپتوکوکوس سوبرینوس (*Streptococcus sobrinus*) و لاکتوباسیل‌ها در شروع و پیشرفت پوسیدگی می‌باشد. این دو گروه از باکتری‌ها قادرند کربوهیدرات‌ها را به سرعت متابولیزه کنند و قادر به زنده ماندن در محیط‌هایی با pH پایین می‌باشند (۱). اعتقاد بر این است که باکتری استرپتوکوکوس موتانس، فاکتور اصلی آغاز پوسیدگی در مینای دندان می‌باشد (۴).

چهره باطنی پوسیدگی دندان، معدنی‌زدایی محلی مینای دندان و تحلیل ساختمان‌های دندانی است که باعث تخریب هیدروکسی آپاتیت می‌شود (۴). این نتایج ناشی از افت شدید موضعی pH در سطح حد فاصل بین پلاک و دندان و معدنی‌زدایی دندان می‌باشد. افت موضعی pH پیامد متابولیسم پلاک است و تنها پلاک‌های با جمعیت کافی باکتریایی قادر به ایجاد افت کافی در pH برای ایجاد فرایند معدنی‌زدایی در دندان‌ها می‌باشند (۳).

باکتری‌های بومی به خصوص استرپتوکوک‌های گروه موتانس (استرپتوکوکوس موتانس و استرپتوکوکوس سوبرینوس) و گونه‌های لاکتوباسیل در بیوفیلم با تولید اسیدهای آلی ضعیف به عنوان محصول تخمیر کربوهیدرات‌ها باعث افت pH به پایین‌تر از حد بحرانی و به دنبال آن باعث معدنی‌زدایی بافت دندان می‌شوند. اگر انتشار کلسیم، فسفات و فلوراید به بیرون از دندان‌ها ادامه یابد در نهایت، شیار ایجاد می‌شود. معدنی‌زدایی در مراحل اولیه از طریق دریافت کلسیم، فسفات و فلوراید برگشت‌پذیر است. پیشرفت پوسیدگی، توقف یا برگشت آن بستگی به تعادل بین معدنی‌زدایی و دوباره معدنی‌شدن دارد (۵). بنابراین پوسیدگی دندان یک فرایند دینامیک شامل تخریب مینای دندان است که توسط گروه‌های خاصی از استرپتوکوک‌ها رخ می‌دهد. این باکتری‌ها برای انجام این عمل ابتدا توسط ادهسین‌هایی (Adhesins) به غشای نازک بزاقی متصل شده و در بیوفیلم در حضور سوکروز و گلوکان‌های سنتز شده توسط گلوکزترانسفرازها تجمع می‌یابند و در نهایت باعث تولید اسید و ایجاد محیطی با pH پایین می‌شود (۶ و ۷).

استفاده از محصولات طبیعی نظیر گیاهان دارویی و مشتقات غذایی و نوشیدنی‌ها برای جلوگیری و درمان بیماری‌های دهان و دندان قدمت چند هزار ساله در جوامع شرقی و غربی دارد (۸). با ظهور پزشکی مدرن، بسیاری از گیاهان به عنوان پایه‌ای برای توسعه داروهای جدید استفاده شده‌اند (۹). از اوایل دهه ۱۹۸۰ گرایش به استفاده از ترکیبات طبیعی بیولوژیکی فعال با پتانسیل درمانی در پزشکی افزایش یافته است (۱۰).

مطالعات زیادی بر روی بررسی اثرات محصولات طبیعی بر رشد ریزسازواره‌های پوسیدگی‌زا به خصوص

استرپتوکوک‌های گروه موتانس متمرکز شده است (۱۱-۱۳). از میان خصوصیات بیماری‌زایی باکتری‌های بیماری‌زای دهانی (مانند استرپتوکوکوس موتانس و پرفیرومونا جینجیوالیس) اتصال به سطوح دندان و لثه که شرط لازم برای تشکیل پلاک دندانی است و باعث القای آسیب به میزبان می‌شود، یک هدف ایده‌آل برای عوامل ضد عفونی طبیعی می‌باشد (۱۴).

با توجه به گسترش مقاومت آنتی‌بیوتیکی، جستجو و تحقیق در مورد عواملی که ویژگی‌های بیماری‌زایی باکتری‌ها (مانند اتصال، تهاجم، تولید توکسین و غیره) را هدف قرار می‌دهند، به عنوان یک استراتژی درمانی جایگزین آنتی‌بیوتیک درمانی در نظر گرفته می‌شود. این روش‌های جایگزین درمانی، باعث مقاومت به عوامل دارویی نمی‌شوند و اثرات مضر بر روی زیست بوم میکروبی میزبان ندارند. مواد غذایی و نوشیدنی‌های طبیعی متنوعی شناخته شده‌اند که شامل مواد فعال زیستی متنوعی می‌باشند که می‌تواند فعالیت ضد بیماری‌زایی بسیار مفید داشته باشند (۱۵).

تعداد قابل توجهی از گزارش‌ها علمی فعالیت ضد میکروبی ترکیباتی که به طور گسترده به عنوان غذاها و نوشیدنی‌های طبیعی مصرف می‌شود را بسیار مفید برای سلامت دهان و دندان اعلام کرده‌اند (۱۵-۲۳). ارزش درمانی و پیشگیری این ترکیبات تا حد زیادی مربوط به مهار اتصال باکتری به سطح مخاط می‌باشد. این ترکیبات اگر در ابتدای روند عفونت حضور داشته باشند می‌توانند فعالیت‌شان را قبل از این‌که باکتری‌ها در بیوفیلم قرار گیرند اعمال کنند (۹).

هدف از مطالعه حاضر، بررسی اثر یکسری ترکیبات طبیعی شامل گلاب، سرکه و عسل که در طب سنتی استفاده گسترده‌ای داشته و به اثر مفید آن‌ها بر دندان و یا لثه اشاره شده (۲۴) بر قدرت تشکیل بیوفیلم ناشی از عوامل اصلی پوسیدگی دندان پرداخته و اثر آن‌ها را با سه دهان‌شویه گیاهی پرسیکا، ماتریکا و سینامول مقایسه کرده است. فرضیه صفر در این پژوهش بدین صورت بیان می‌شود که میانگین تأثیر ترکیبات طبیعی و سه دهان‌شویه بر اتصال باکتری استرپتوکوکوس موتانس و استرپتوکوکوس سوبرینوس (در دو آزمایش) برابر می‌باشد.

مواد و روش‌ها

سویه‌های باکتریایی و شرایط رشد: در این تحقیق از دو سویه استاندارد استرپتوکوکوس موتانس (ATCC 35668) و استرپتوکوکوس سوبرینوس (ATCC 27607) استفاده شد. این سویه‌ها در محیط کشت آبگوشت عصاره‌های مغز و قلب (Brain heart infusion broth) (Quelab) کشت داده شدند و به مدت ۱۸-۲۰ ساعت در شرایط ۵۰ CO2 درصد، گرمخانه‌گذاری شدند.

ترکیبات طبیعی و دهان‌شویه‌ها: گلاب (Rabia, Irangolab, Iran)، سرکه (Varda, Varda Co., Iran) و عسل گشنیز (Veshand, Keshtzar Sabz Co. Iran) به عنوان ترکیبات طبیعی خریداری شد. سه دهان‌شویه گیاهی پرسیکا (Persica, Pursina pharmacy, Iran) (حاوی گیاه مسواک، نعناع و بومادران)، ماتریکا (Matrica mouth wash, Barij Essence Pharmaceutical Co., Iran) (حاوی عصاره بابونه آلمانی) و سینامول (Cinnamol, Goldaru Co. Iran) (حاوی عصاره هیدروالکلی غنچه و گل میخک، پوست ساقه دارچین و میوه هل) نیز تهیه شد. گلاب بدون تهیه رقت، سرکه و عسل با غلظت (w/v) ۱۰- درصد و دهان‌شویه‌ها مطابق دستور ساختشان که بر روی قوطی حاوی دهان‌شویه درج شده بود (پرسیکا: ۱۵ قطره در ۱۵ میلی لیتر آب، ماتریکا: ۳۰ قطره در ۲۰ میلی‌لیتر آب و سینامول: ۲۵ قطره در ۳۰ میلی‌لیتر آب) مورد استفاده قرار گرفت. این پژوهش در دانشکده علوم و فناوری‌های نوین دانشگاه اصفهان انجام شد. جامعه آماری در این پژوهش، گلاب، سرکه و عسل به عنوان ترکیبات طبیعی و دهان‌شویه‌های پرسیکا، ماتریکا و سینامول به عنوان دهان‌شویه‌های گیاهی می‌باشد.

بررسی کمی قدرت اتصال و چسبندگی عوامل بیماری‌زا به روش میکروتیترپلیت: برای بررسی قدرت تشکیل بیوفیلم و چسبندگی عوامل بیماری‌زا از روش میکروتیترپلیت استفاده شد. از هر کدام از باکتری‌های پاتوژن کشت ۱۸ تا ۲۴ ساعته در TSB (Triptic soy broth) کامل شده با یک درصد سوکروز تهیه شد. سپس از باکتری‌های رشد یافته در این محیط کدورتی معادل نیم مک‌فارلند تهیه شد. ۲۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی به هر چاهک در میکروتیترپلیت انتقال داده شد. هر ۸ چاهک در میکروتیترپلیت با یک سوسپانسیون باکتریایی مشخص پر شدند. چاهک‌های شاهد تنها حاوی محیط کشت استریل بودند. سطح پلیت‌ها پوشانده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه و CO2 ۵۰ درصد گرم‌خانه‌گذاری شد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت محلول مواد غذایی و سوسپانسیون باکتریایی به منظور حذف سلول‌های پلانکتونیک یا غیر متصل در حین شستن به شدت تکان داده شدند. شستشو سه مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر PBS (Phosphate buffered saline) انجام گرفت. باکتری‌های متصل به دیواره و کف چاهک با ۲۵۰ میکرولیتر اتانول ۹۶ درصد تثبیت شدند. بعد از ۱۵ دقیقه محتویات چاهک‌ها تخلیه و پلیت‌ها در محلی در آزمایشگاه قرار داده شدند تا خشک شوند. بعد از خشک شدن پلیت‌ها به مدت ۵ دقیقه با کریستال ویوله ۲ درصد رنگ‌آمیزی شدند و بعد از گذشت این مدت زمان رنگ‌های اضافی از طریق قرار دادن پلیت‌ها در مسیر آب شهری شسته شدند و در ادامه در دمای آزمایشگاه قرار داده شدند تا خشک شوند. سپس سنجش کمی بیوفیلم به وسیله اضافه کردن ۲۰۰ میکرولیتر اسید استیک گلایسال ۳۳ درصد به هر چاهک صورت گرفت و جذب نوری رنگ کریستال‌ویوله موجود در حلال رنگ‌بر در طول موج ۴۹۲ نانومتر توسط دستگاه الیزاریدر (WARENESS, Technology INC) خوانده شد. در نهایت دسته‌بندی باکتری‌ها بر اساس جذب نوری OD (Optical density) بیوفیلم باکتری به صورت زیر انجام گرفت.

OD: میانگین جذب نوری یک باکتری

ODc: میانگین جذب نوری چاهک‌های شاهد

غیر چسبنده: $OD \leq ODc$

چسبندگی ضعیف: $ODc < OD \leq 2OD$

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

چسبندگی قوی: $4OD_c < OD$

رده‌بندی نتایج به دست آمده از آزمایش میکروتیتر پلیت از طریق مقایسه میانگین به دست آمده از چاهک‌های برای هر باکتری با میانگین OD به دست آمده از چاهک‌های شاهد می‌باشد (۲۵).

تأثیر ترکیبات طبیعی و دهان‌شویه‌ها بر قدرت تشکیل بیوفیلم توسط عوامل بیماری‌زا: برای انجام این مرحله نیز از روش میکروتیتر پلیت استفاده شد. از کشت ۲۴-۱۸ ساعته باکتری‌های پاتوژن در TSB کامل شده با یک درصد سوکروز کدورتی معادل نیم مک‌فارلند تهیه شد. این سوسپانسیون به نسبت ۱ به ۱۰۰ در TSB کامل شده با یک درصد سوکروز رقیق‌سازی شد. هر کدام از ترکیبات طبیعی گلاب، سرکه و عسل و دهان‌شویه‌های گیاهی پرسیکا، ماتریکا و سینامول با رقت فوق‌الذکر به صورت مجزا برای تأثیر بر قدرت تشکیل بیوفیلم به کار برده شد. دو روش برای بررسی استفاده شد.

روش اول: ۲۰۰ میکرولیتر از مخلوط هم‌حجم از سوسپانسیون باکتری بیماری‌زا و ترکیبات طبیعی و دهان‌شویه‌ها (۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری بیماری‌زا همراه با ۱۰۰ میکرولیتر ترکیبات طبیعی و دهان‌شویه‌ها) به هر چاهک در میکروتیتر پلیت‌ها انتقال داده شد. چاهک‌های شاهد حاوی ۲۰۰ میکرولیتر از مخلوط هم حجم از سوسپانسیون باکتری و PBS بودند (۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری +۱۰۰ میکرولیتر PBS).

روش دوم: ۱۰۰ میکرولیتر از ترکیبات طبیعی و دهان‌شویه‌ها ابتدا وارد هر چاهک در میکروتیتر پلیت شد و بعد از نیم ساعت سوسپانسیون باکتریایی بیماری‌زا به هر

چاهک اضافه شد. در چاهک‌های شاهد، ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر PBS و بعد از نیم ساعت ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتریایی بیماری‌زا اضافه شد. سپس سطح پلیت پوشانده شد و در انکوباتور به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه و CO2 ۵۰ درصد گرمخانه‌گذاری شد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت محتویات چاهک خارج شد و چاهک‌ها سه مرتبه با PBS شسته شدند، این کار به دلیل حذف سلول‌های غیر متصل انجام شد. در این مرحله سلول‌های چسبیده به کف هر چاهک با کریستال ویوله ۲ درصد رنگ‌آمیزی شدند. بعد از گذشت ۵ دقیقه چاهک‌ها با آب شیر شسته شدند و با ۲۰۰ میکرولیتر اسید استیک گلایسال ۳۳ درصد پر شدند. بعد از ۱۵ دقیقه جذب نوری هر چاهک در طول موج ۴۹۲ نانومتر توسط دستگاه الیزاریدر خوانده شد و با مقایسه با چاهک‌های شاهد درصد کاهش اتصال آن‌ها بررسی شد (۲۶).

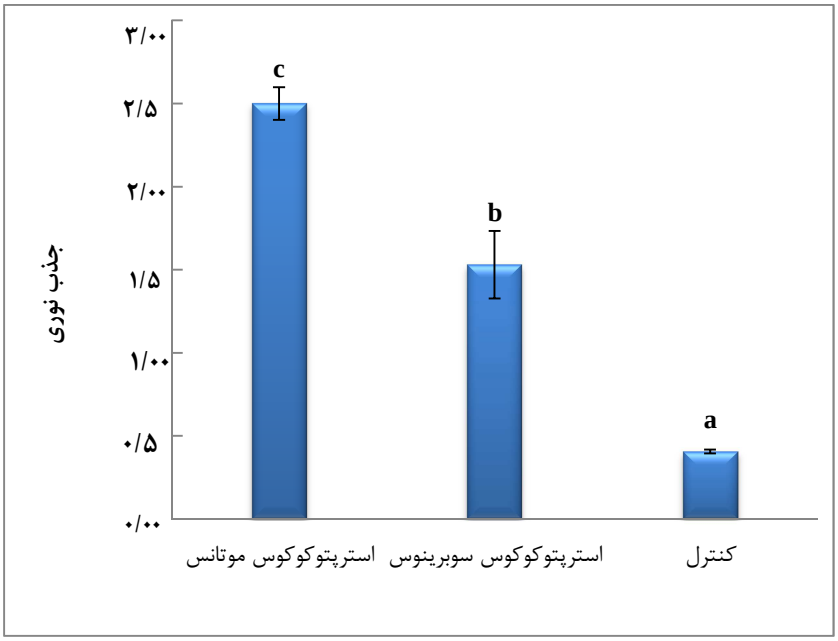
بررسی اثر ترکیبات طبیعی و دهان‌شویه‌ها بر مهار رشد استرپتوکوک‌ها:

- در مورد اثر گلاب، سرکه و عسل و سه دهان‌شویه گیاهی (پرسیکا، ماتریکا و سینامول) بر روی توانایی رشد استرپتوکوک‌ها از روش چاهک پلیت استفاده شد.
- از استرپتوکوکوس موتانس و استرپتوکوکوس سوبرینوس کشت ۱۸-۲۰ ساعته در محیط Brain Heart Infusion Broth (BHI Broth) تهیه گردید.
- بعد از رشد باکتری‌های استرپتوکوک در محیط (BHI Broth) از هر کدام از باکتری‌ها سوسپانسیون میکروبی معادل نیم مک‌فارلند تهیه شد.
- سوآپ استریل در لوله‌های حاوی سوسپانسیون باکتری برده و روی محیط مولرهینتون‌آگار کامل شده با ۵ درصد خون دفیبرینه گوسفند کشت داده شد.
- پلیت‌های تلقیح شده به مدت ۳ تا ۵ دقیقه روی سطح صاف قرار داده شدند تا رطوبت اضافی جذب شود.
- به کمک قسمت انتهایی یک پیپت‌پاستور استریل حفره‌های یکسانی روی محیط ایجاد شد و در هر چاهک یک قطره از محیط مولرهینتون آگار مذاب ریخته شد تا ته حفره‌ها مسدود شود.
- سپس ۱۰۰ میکرولیتر از هر کدام از ترکیبات طبیعی گلاب، سرکه و عسل و دهان‌شویه‌های گیاهی پرسیکا، ماتریکا و سینامول با رقت فوق‌الذکر به صورت مجزا برای تأثیر بر قدرت تشکیل بیوفیلم به کار برده شد.
- نمونه‌های ترکیبات مورد نظر در هر حفره وارد و از آب مقطر به عنوان شاهد منفی استفاده شد.
- پلیت‌ها به مدت یک ساعت در یخچال قرار داده تا ترکیبات مورد بررسی قبل از رشد و تکثیر استرپتوکوک‌ها فرصت انتشار در محیط را داشته باشند.
- پلیت‌ها به مدت ۱۶-۲۰ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند و قطر هاله عدم رشد بعد از این مدت اندازه‌گیری شد (۲۷).

در این تحقیق از نرم افزارهای SPSS نسخه ۱۵ (version 15, SPSS Inc., Chicago, IL) (با استفاده از روش آزمون میانگین دو جامعه مستقل) و Excel برای محاسبه و رسم نمودارها استفاده شد (به علت وجود تنها دو گروه برای مقایسه استفاده از روش تحلیل واریانس یک عامله (One-way ANOVA) امکان‌پذیر نبوده در نتیجه روش آماری در این مقاله به روش میانگین دو جامعه مستقل انجام گرفت). برای رسم نمودارها در Excel از اطلاعات به دست آمده از انحراف معیار و میانگین‌ها استفاده شد (لازم به ذکر است اگر p value < ۰/۰۵ بود اختلاف معنی‌داری بین داده‌ها وجود داشت). نتایج گزارش شده بر مبنای سه بار تکرار (بر روی سه نمونه مختلف) از هر روش آزمایشی می‌باشد.

یافته‌ها

تشکیل بیوفیلم: بررسی قدرت تشکیل بیوفیلم و چسبندگی عوامل بیماری‌زا با روش میکروتیتر پلیت نشان داد استرپتوکوکوس موتانس با جذب نوری ۲/۵ از چسبندگی قوی و استرپتوکوکوس سوبرینوس با جذب نوری ۱/۵۳ از چسبندگی متوسط برخوردار است (نمودار ۱).



نمودار ۱: میانگین تشکیل بیوفیلم استرپتوکوکوس موتانس و استرپتوکوکوس سوبرینوس بر مبنای جذب نوری
(ستون‌ها: میانگین خطوط بالای نمودار: انحراف معیار)

OD_c: میانگین جذب نوری یک باکتری
OD_c: میانگین جذب نوری چاهک‌های شاهد
$OD \leq OD_c$: غیر چسبنده
$OD_c < OD \leq 2OD_c$: چسبندگی ضعیف
$2OD_c < OD \leq 4OD_c$: چسبندگی متوسط
$4OD_c < OD$: چسبندگی قوی

تأثیر گلاب، سرکه و عسل بر قدرت اتصال و چسبندگی سویه‌های استرپتوکوک

روش اول: کاربرد همزمان استرپتوکوک‌ها و ترکیبات طبیعی مورد آزمایش

در این روش، سرکه، گلاب و عسل سبب کاهش قدرت اتصال استرپتوکوکوس موتانس و نیز کاهش قدرت اتصال استرپتوکوکوس سوبرینوس شدند (جدول ۱).

روش دوم: کاربرد ترکیبات طبیعی مورد آزمایش قبل از استرپتوکوک‌ها

در این روش، سرکه، گلاب و عسل سبب کاهش قدرت اتصال استرپتوکوکس موتانس و نیز کاهش قدرت اتصال استرپتوکوکوس سوبرینوس شدند (جدول ۱).

در هر دو روش تأثیر سرکه و عسل بر کاهش قدرت اتصال باکتری استرپتوکوکوس موتانس بیشتر از گلاب بوده است و این اختلاف معنی‌دار است (p value =۰ /۰۱). در مورد تأثیر این مواد بر استرپتوکوکوس سوبرینوس تأثیر سرکه به طور معنی‌داری از سایر مواد بیشتر است (p value = ۰/۰۰۱). اما تأثیر گلاب و عسل اختلاف معنی‌داری را نشان نمی‌دهد (p value = ۰/۳).

در مورد تأثیر عسل بر اتصال استرپتوکوکوس موتانس بین روش اول و روش دوم اختلاف معنی‌داری وجود ندارد (p value = ۰/۴۶) اما در مورد تأثیر آن بر اتصال استرپتوکوکوس سوبرینوس بین روش اول و روش دوم اختلاف معنی‌داری وجود دارد (p value = ۰/۰۵).

همچنین در مورد تأثیر گلاب بر اتصال استرپتوکوکوس موتانس بین روش اول و روش دوم اختلاف معنی‌داری وجود دارد (p value = ۰/۰۰۱) ولی تأثیر بر اتصال استرپتوکوکوس سوبرینوس این اختلاف معنی‌دار نیست (p value = ۰/۹۲).

جدول ۱: میانگین تأثیر سرکه، گلاب و عسل بر قدرت اتصال باکتری استرپتوکوکوس موتانس و استرپتوکوکوس سوبرینوس

ترکیبات طبیعی	استرپتوکوکوس	میانگین درصد کاهش اتصال		انحراف معیار		P	
		روش اول	روش دوم	روش اول	روش دوم	روش اول	روش دوم
سرکه	استرپتوکوکوس موتانس	۰/۴۳	۴۵/۶۶	۷/۹۳	۷/۲۳	۰/۱۸	۰/۱۸
	استرپتوکوکوس سوبرینوس	۲۱/۶۷	۰/۲۳	۲/۳۰	۰/۱۰	۰/۴۱	۰/۴۳
گلاب	استرپتوکوکوس موتانس	۰/۰۰	۱۸/۶۶	۰/۰۰	۲/۸۸	۰/۰۰	۰/۰۰
	استرپتوکوکوس سوبرینوس	۰/۱۲	۱۲/۳۰	۳/۴۶	۴/۰۴	۰/۹۱	۰/۹۱
عسل	استرپتوکوکوس موتانس	۴۳/۶۶	۰/۴۱	۷/۳۷	۷/۵۴	۰/۴۶	۰/۴۷
	استرپتوکوکوس سوبرینوس	۱۲/۳۳	۱۷/۳۳	۰/۵۷	۳/۰۵	۰/۰۵	۰/۱۰

p value ≤ ۰/۰۵: نشان دهنده اختلاف معنی‌داری بین داده‌ها می‌باشد
روش اول: اضافه کردن همزمان ترکیبات طبیعی و استرپتوکوک‌ها در چاهک‌های میکروتیتر پلیت
روش دوم: اضافه کردن استرپتوکوک‌ها بعد از گذشت نیم ساعت از تلقیح ترکیبات طبیعی در چاهک‌های میکروتیتر پلیت

تأثیر دهان‌شویه‌های گیاهی بر قدرت اتصال و چسبندگی سویه‌های استرپتوکوک

روش اول: کاربرد همزمان استرپتوکوک‌ها و دهان‌شویه‌های گیاهی مورد آزمایش

در این روش دهان‌شویه‌های پرسیکا، ماتریکا و سینامول سبب کاهش قدرت اتصال استرپتوکوکوس موتانس و نیز کاهش قدرت اتصال استرپتوکوکوس سوبرینوس شدند (جدول ۲).

روش دوم: کاربرد همزمان استرپتوکوک‌ها و دهان‌شویه‌های گیاهی مورد آزمایش

در این روش دهان‌شویه‌های پرسیکا، ماتریکا و سینامول سبب کاهش قدرت اتصال استرپتوکوکوس موتانس و نیز کاهش قدرت اتصال استرپتوکوکوس سوبرینوس شدند (جدول ۲).

در هر دو روش تأثیر دهان‌شویه‌های مورد مطالعه بر کاهش قدرت اتصال استرپتوکوکوس موتانس قابل توجه است و اختلاف معنی‌داری را نشان نمی‌دهد (p value = ۰/۱). این تأثیر در مورد استرپتوکوکوس سوبرینوس کمتر است و تأثیر دهان‌شویه سینامول از دو دهان‌شویه دیگر به طور معنی‌داری کمتر می‌باشد (p value = ۰/۰۱).

بین استفاده از روش اول یا دوم در کاربرد دهان‌شویه‌ها اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد (مقادیر P در جدول ۲ آمده است).

جدول ۲: میانگین تأثیر دهان‌شویه‌های گیاهی پرسیکا، ماتریکا و سینامول بر قدرت اتصال باکتری استرپتوکوکوس موتانس و استرپتوکوکوس سوبرینوس

دهان‌شویه	استرپتوکوکوس	درصد کاهش اتصال		انحراف معیار		P	
		روش اول	روش دوم	روش اول	روش دوم	روش اول	روش دوم
پرسیکا	استرپتوکوکوس موتانس	۰/۳۹	۳۹/۶۷	۰/۱۰	۰/۵۷	۰/۳۷	۰/۳۸
	استرپتوکوکوس سوبرینوس	۱۶/۳۳	۲۰/۶۷	۲/۳۰	۱/۵۲	۰/۰۵	۰/۰۶
ماتریکا	استرپتوکوکوس موتانس	۳۹/۳۰	۳۶/۶۷	۱/۱۵	۱/۵۲	۰/۰۷	۰/۰۷
	استرپتوکوکوس سوبرینوس	۱۷/۶۷	۱۷/۶۷	۰/۵۷	۰/۵۷	۱/۰۰	۱/۰۰
سینامول	استرپتوکوکوس موتانس	۰/۴۱	۴۱/۳۰	۵/۲۹	۲/۰۸	۰/۹۲	۰/۹۲
	استرپتوکوکوس سوبرینوس	۱۲/۶۷	۰/۱۱	۲/۵۱	۱/۷۳	۰/۳۹	۰/۴۰

P ≤ ۰/۰۵: نشان دهنده اختلاف معنی‌داری بین داده‌ها می‌باشد
روش اول: اضافه کردن همزمان دهان‌شویه‌ها و استرپتوکوک‌ها در چاهک‌های میکروتیتر پلیت
روش دوم: اضافه کردن استرپتوکوک‌ها بعد از گذشت نیم ساعت از تلقیح دهان‌شویه‌ها در چاهک‌های میکروتیتر پلیت

مقایسه تأثیر سرکه، گلاب، عسل و دهان شویه‌های پرسیکا، ماتریکا و سینامول بر قدرت اتصال و چسبندگی سویه‌های استرپتوکوک

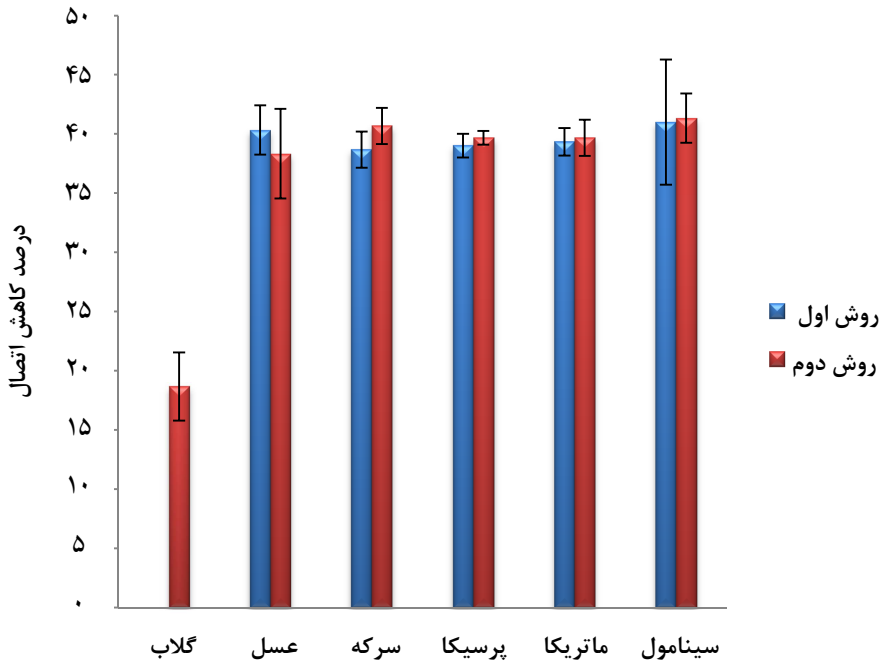
روش اول: مقایسه تأثیر مواد مذکور در این روش حاکی از تأثیر مشابه همه آن‌ها به غیر از گلاب بر قدرت اتصال استرپتوکوکوس موتانس است و در مورد این تأثیر اختلاف معنی‌داری بین مواد مذکور (غیر از گلاب) دیده نمی‌شود (p value = ۰/۲) (نمودار ۲).

تأثیر مواد مورد مطالعه (به استثنای سرکه) بر روی اتصال استرپتوکوکوس سوبرینوس نسبتاً مشابه بوده هر چند در کل تأثیر مواد مذکور به استثنای گلاب بر استرپتوکوکوس موتانس، بیشتر از استرپتوکوکوس سوبرینوس است (نمودار ۳).

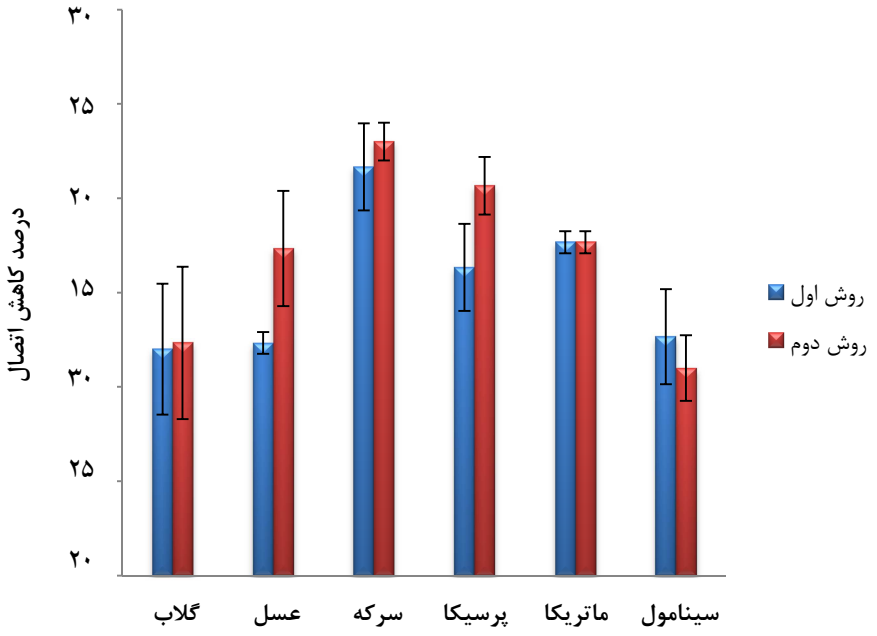
روش دوم: مقایسه تأثیر مواد مذکور در این روش حاکی از تأثیر مشابه همه آن‌ها به غیر از گلاب، در کاهش قدرت اتصال استرپتوکوکوس موتانس است و در مورد این تأثیر اختلاف معنی‌داری بین مواد مذکور (غیر از گلاب) دیده نشد (p value = ۰/۱). در مورد تأثیر بر اتصال استرپتوکوکوس سوبرینوس، اثر کاهشی سینامول به طور معنی‌داری (p value = ۰/۰۱) از بقیه ترکیبات کمتر است. هر چند سرکه و دهان‌شویه پرسیکا تأثیر بیشتر در کاهش قدرت اتصال این باکتری داشته، اما این اختلاف معنی‌دار نیست (p value = ۰/۲).

مقایسه تأثیر دو روش کاربرد بر قدرت اتصال استرپتوکوک‌های مورد مطالعه

در مورد کاهش اتصال استرپتوکوکوس موتانس به غیر از گلاب، سایر موارد اختلاف معنی‌داری در دو روش کاربرد نشان نمی‌دهند (p value = ۰/۲). گلاب در روش اول تأثیر بر کاهش اتصال استرپتوکوکوس موتانس نداشت ولی در روش دوم تأثیر داشت. در مورد کاهش قدرت اتصال استرپتوکوکوس سوبرینوس به غیر از سینامول، مواد مورد مطالعه اختلاف معنی‌داری در روش‌های اول و دوم نشان ندادند (p value = ۰/۴).



نمودار ۲: میانگین ترکیبات طبیعی و دهان‌شویه‌ها بر کاهش قدرت اتصال باکتری استرپتوکوکوس موتانس
(ستون‌ها: میانگین خطوط بالای نمودار: انحراف معیار)



نمودار ۳: میانگین ترکیبات طبیعی و دهان‌شویه‌ها بر کاهش قدرت اتصال باکتری استرپتوکوکوس سوبرینوس
(ستون‌ها: میانگین خطوط بالای نمودار: انحراف معیار)

بررسی اثر گلاب، سرکه و عسل بر میزان رشد سویه‌های استرپتوکوک

در آزمایش سنجش اثر سرکه بر میزان رشد استرپتوکوک‌ها در روش چاهک‌گذاری، میانگین سه بار تکرار، قطر هاله عدم رشد را در مورد استرپتوکوکوس موتانس ۱۵ میلی‌متر و در مورد استرپتوکوکوس سوبرینوس ۱۱ میلی‌متر نشان داد (جدول ۳). گلاب و عسل، هاله عدم رشدی را در مورد استرپتوکوکوس موتانس و استرپتوکوکوس سوبرینوس نشان ندادند.

بررسی اثر دهان‌شویه‌های پرسیکا، ماتریکا و سینامول بر میزان رشد سویه‌های استرپتوکوک

بررسی اثر دهان‌شویه‌ها بر مهار رشد استرپتوکوک‌ها در آزمایش چاهک‌گذاری میانگین قطر هاله عدم رشد (در سه بار تکرار این آزمایش)، در مورد استرپتوکوکوس موتانس به میزان ۱۰، ۷ و ۷ به ترتیب برای دهان‌شویه‌های پرسیکا، ماتریکا و سینامول مشاهده شد. قطر هاله عدم رشد استرپتوکوکوس سوبرینوس به میزان ۷، ۸ و ۱۰ به ترتیب برای دهان‌شویه‌های پرسیکا، ماتریکا و سینامول مشاهده شد (جدول ۴).

نتایج نشان می‌دهد دهان‌شویه پرسیکا، بیشترین هاله عدم رشد استرپتوکوکوس موتانس را در مورد استرپتوکوکوس موتانس و استرپتوکوکوس سوبرینوس ایجاد کرده است هر چند این اختلاف معنی‌دار نیست (p value = ۰/۱).

مقایسه اثر ترکیبات مختلف بر میزان رشد سویه‌های استرپتوکوک

در مورد استرپتوکوکوس موتانس، بیشترین تأثیر ممانعت از رشد مربوط به سرکه می‌باشد (اختلاف معنی‌دار است (p value = ۰/۰۱)، گلاب و عسل نیز تأثیر ممانعتی بر رشد این باکتری ندارند.

در مورد استرپتوکوکوس سوبرینوس، بیشترین تأثیر ممانعت از رشد مربوط به سرکه و پرسیکا می‌باشد (اما اختلاف معنی‌دار نیست (p value = ۰/۰۱)، گلاب و عسل نیز تأثیر ممانعتی بر رشد این باکتری ندارند.

جدول ۳: میانگین تأثیر دهان‌شویه‌های گیاهی پرسیکا، ماتریکا و سینامول بر قدرت اتصال باکتری استرپتوکوکوس موتانس و استرپتوکوکوس سوبرینوس

ترکیب طبیعی مورد آزمایش	استرپتوکوکوس	میانگین قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر)
سرکه	استرپتوکوکوس موتانس	۱۵
	استرپتوکوکوس سوبرینوس	۱۱
عسل	استرپتوکوکوس موتانس	۰
	استرپتوکوکوس سوبرینوس	۰
گلاب	استرپتوکوکوس موتانس	۰
	استرپتوکوکوس سوبرینوس	۰

جدول ۴: میانگین قطر هاله عدم رشد دهان‌شویه‌های پرسیکا، ماتریکا و سینامول با روش چاهک‌گذاری

ترکیب طبیعی مورد آزمایش	استرپتوکوکوس	میانگین قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر)
پرسیکا	استرپتوکوکوس موتانس	۱۰
	استرپتوکوکوس سوبرینوس	۱۰
ماتریکا	استرپتوکوکوس موتانس	۷
	استرپتوکوکوس سوبرینوس	۸
سینامول	استرپتوکوکوس موتانس	۷
	استرپتوکوکوس سوبرینوس	۷

بحث

تاکنون گزارش‌های محدودی در مورد اثر برخی از ترکیبات طبیعی بر عوامل پوسیدگی دندان منتشر شده است. بخشی از این مطالعات اثر ضد میکروبی عسل را بر علیه عوامل بیماری‌زا از جمله عوامل بیماری‌زای پوسیدگی دندان را نشان می‌دهد (۳۰-۲۸). عسل، به عنوان یک منبع مغذی است که از زمان‌های بسیار قدیم در پزشکی مورد استفاده قرار می‌گرفته است. مکانیسم ضد میکروبی عسل هنوز کاملاً روشن نیست. در میان مکانیسم‌های ممکن، فاکتورهای مهار کننده موجود مانند فلاونوئیدها، هیدروژن پراکساید، pH پایین و اسمولاریته بالا به خاطر غلظت قند آن به عنوان عوامل ضد میکروبی شناخته شده است. اثر عسل بر روی بیوفیلم استرپتوکوکوس موتانس می‌تواند خاصیت ضد باکتریایی و پوسیدگی‌زایی عسل را نشان دهد (۳۱).

احمدی و همکاران (۳۲) فعالیت ضد میکروبی عسل طبیعی همدان را بر استرپتوکوکوس موتانس و لاکتوباسیل‌ها در غلظت‌های ۱۰۰، ۵۰، ۲۰، ۱۰، ۵، ۰ درصد (w/v) مورد بررسی قرار دادند. نتایج این بررسی نشان داد که این عسل در غلظت‌های بیشتر از ۲۰ درصد علیه استرپتوکوکوس موتانس و در غلظت ۱۰۰ درصد علیه لاکتوباسیل‌ها فعالیت ضد میکروبی دارد.

Badet و Quero (۳۳) اثر عسل مانوکا را بر رشد و اتصال استرپتوکوکوس موتانس به صورت in vitro مورد مطالعه قرار دارند. آن‌ها گزارش دادند که این عسل در غلظت ۲۰۰ µg/ml باعث مهار رشد استرپتوکوکوس موتانس شد و در این غلظت مهار اتصال ضعیفی را نشان داد، اما در غلظت ۵۰۰ µg/ml اثر مهار اتصال بالایی را نشان داد.

در مطالعه حاضر اثر عسل در غلظت (w/v) ۱۰ درصد بر مهار تشکیل بیوفیلم، حذف بیوفیلم و فعالیت ضد میکروبی استرپتوکوک‌ها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج کاهش تشکیل بیوفیلم را در مورد استفاده از عسل نشان داد. این کاهش در مورد استرپتوکوکوس سوبرینوس کم بوده است.

این نتایج در کل با یافته‌های محققین قبلی در مورد استرپتوکوکوس موتانس همخوانی دارد. تفاوت‌های کمی می‌تواند به غلظت و نوع عسل به کار رفته مربوط باشد.

همچنین در مطالعه حاضر عدم توانایی عسل مورد مطالعه در ممانعت از رشد استرپتوکوک‌ها نشان داده شد. علت این تفاوت در نتیجه ممکن است به نوع عسل و غلظت آن مرتبط باشد، بنابراین مطالعات بیشتری برای قضاوت قطعی در این زمینه مورد نیاز است. در مورد تأثیر عسل بر رشد استرپتوکوکوس سوبرینوس یا ممانعت از بیوفیلم آن گزارشی مشاهده نشد.

در طب سنتی گلاب به عنوان ماده‌ای برای استحکام دندان و تسکین پوسیدگی معرفی شده است. در مطالعه رمضانعلی‌زاده و همکاران اثر گلاب بر کاهش اتصال، رشد و حذف بیوفیلم استرپتوکوک‌ها مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج این تحقیق نشان داد که گلاب، باعث کاهش اتصال استرپتوکوکوس موتانس و استرپتوکوکوس سوبرینوس می‌شود، اما در حذف بیوفیلم و مهار رشد آن‌ها مؤثر نیست (۳۴).

در بررسی حاضر نیز عدم توانایی گلاب در مهار رشد و حذف بیوفیلم استرپتوکوکوس موتانس مشاهده شد، هر چند اثر ضد اتصالی گلاب بر روی استرپتوکوکوس موتانس مشاهده شد. در مورد استرپتوکوکوس سوبرینوس نیز گلاب، توانایی مهار رشد و حذف بیوفیلم استرپتوکوکوس سوبرینوس را نداشت، اما این ماده طبیعی اثر ضد اتصالی بر روی استرپتوکوکوس سوبرینوس را نشان داد.

در مطالعه حاضر اثر سرکه بر مهار رشد و کاهش اتصال استرپتوکوکوس موتانس و استرپتوکوکوس سوبرینوس و حذف بیوفیلم تشکیل شده توسط استرپتوکوک‌ها مورد بررسی قرار گرفت. سرکه، به عنوان ترکیب طبیعی نسبت به سایر ترکیبات طبیعی مورد مطالعه، بهترین اثر را در مورد مهار رشد و کاهش اتصال استرپتوکوک‌ها نشان داد. Komiyama و همکاران (۳۵)، در مقاله‌ای با عنوان ارزیابی روش‌های جایگزین برای ضد عفونی کردن مسواک، به بررسی اثر ضد میکروبی و ضد عفونی کننده کلرهگزیدین ۰/۱۲ درصد، سرکه سفید ۰/۵۰ درصد و دو ماده دیگر بر روی استرپتوکوکوس موتانس، استرپتوکوکوس پیوژنز، استافیلوکوکوس اورئوس و کاندیدا آلبیکنس بر روی مسواک پرداختند. در مورد سرکه نشان داده شد که باعث کاهش جمعیت استرپتوکوکوس موتانس، استرپتوکوکوس پیوژنز و استافیلوکوکوس اورئوس می‌شود.

در مورد اثر سرکه بر حذف بیوفیلم، نتایج مطالعه حاضر نشان داد که این ماده توانایی حذف کامل بیوفیلم بعد از تشکیل بیوفیلم ندارد. هرچند در مورد استرپتوکوکوس موتانس آن را تا حدود ۴۵ درصد کاهش می‌دهد. در مورد اثر سرکه بر حذف بیوفیلم استرپتوکوک‌های عامل پوسیدگی دندان، مطالعه‌ای یافت نشد، بنابراین به دو مطالعه مشابه اشاره می‌شود. Ismael (۳۶) با بررسی تأثیر چند نوع سرکه روی بیوفیلم ۲۹ استرپتوکوک پیوژنز جداسازی شده از بیماران، نشان داد که سرکه‌ها باعث حذف بیش از ۹۰ درصدی بیوفیلم می‌شود.

جعفری و همکاران (۳۷) در مطالعه‌ای با مقایسه تأثیر هیپوکلریت سدیم با سرکه سفید برای حذف کاندیدا آلبیکنس از رزین آکریلیک به این نتیجه رسیدند که هیپوکلریت سدیم ۱ درصد و سرکه ۱۰ درصد، سلول‌های کاندیدا آلبیکنس را صد درصد از بین می‌برند و سرکه ۵ درصد باعث حذف ۹۹ درصدی اتصال کاندیدا آلبیکنس می‌شود.

در مورد مکانیسم اثر ضد میکربی سرکه بر ضد استرپتوکوک‌های دهانی، مطالعات گسترده مورد نیاز است. شاید علاوه بر اثر اسیدی سرکه، برخی ترکیبات آن نیز در این جهت مؤثرند. چنان‌چه Thimothe و همکاران (۳۸)، اثر پلی‌فنول‌های استخراج شده از انگور (که در سرکه انگور نیز وجود دارد) بر تعدادی از فاکتورهای بیماری‌زای استرپتوکوکوس موتانس مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که پلی‌فنول‌ها باعث مهار گلوکزترانسفرازهای GTF (Glycosyltransferase) استرپتوکوکوس موتانس شد.

به نظر می‌رسد علت عدم استفاده از سرکه برای مصارفی چون پیشگیری از پوسیدگی دندان، به خاطر ویژگی اسیدی این ماده و اثر تخریبی احتمالی بر مینای دندان باشد، لذا تعدیل اسیدیته سرکه و رساندن آن به حد مجاز را می‌توان مورد توجه قرار داد.

چندین مطالعه در مورد اثر ضد میکروبی دهان‌شویه پرسیکا، ماتریکا و سینامول انجام شده است که نتایج این مطالعات نشان داد که این دهان‌شویه‌های گیاهی باعث کاهش شاخص پلاک (Plaque index) و بیماری‌های مربوط به لثه و پلاک میکروبی شدند (۳۹-۴۳).

در مطالعه‌ای که توسط عطایی و همکاران انجام شد، اثرات ضد قارچ و ضد باکتریایی دهان‌شویه‌های پرسیکا، ماتریکا، ایرالوکس با کلرهگزیدین گلوکونات در مورد استرپتوکوکوس سوبرینوس، استرپتوکوکوس سنگوئیس، استرپتوکوکوس سالیواریوس، کاندیدا آلبیکنز و آسپرژیلوس ویسکوسوس مقایسه شد. نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که دهان‌شویه‌های گیاهی در مقایسه با دو نوع دهان‌شویه کلرهگزیدین، اثرات ضد باکتریای کمتری دارند که این نتیجه از لحاظ آماری معنی‌دار بود ($p\ value < ۰/۰۱$)؛ اما اثرات ضد باکتریایی دهان‌شویه ماتریکا نسبت به سایر دهان‌شویه‌های این تحقیق اثر ضد باکتریایی بهتری را نشان داد (۴۴).

عابد و کتابی (۴۵) نیز در تحقیقی که بر روی تأثیر دهان‌شویه‌های پرسیکا و کلرهگزیدین بر کاهش التهاب لثه‌ای انجام دادند، نتیجه گرفتند که کلرهگزیدین و پرسیکا هر دو در کاهش التهاب و خونریزی لثه مؤثر می‌باشند. اما کلرهگزیدین در مقایسه با پرسیکا مؤثرتر است. آن‌ها همچنین اعلام کردند پرسیکا را می‌توان به عنوان دهان‌شویه‌ای مطمئن در موارد ژنژویت کم تا متوسط تجویز کرد.

در بررسی‌های انجام شده تحقیقی که فعالیت این سه دهان‌شویه را بر مهار رشد باکتری‌های عامل پوسیدگی دندان و تشکیل پلاک مقایسه کند، یافت نشد. در مطالعه حاضر برای اولین بار مهار رشد، کاهش اتصال و حذف بیوفیلم تشکیل شده توسط استرپتوکوکوس موتانس و استرپتوکوکوس سوبرینوس توسط سه دهان‌شویه پرسیکا (حاوی گیاه مسواک)، ماتریکا (حاوی گیاه بابونه) و سینامول (حاوی عصاره میخک و پوسته ساقه دارچین) مورد بررسی قرار گرفت که نتایج خاصیت ضد میکروبی این سه دهان‌شویه را نشان داد. این سه دهان‌شویه نیز کاهش اتصال استرپتوکوکوس موتانس و استرپتوکوکوس سوبرینوس را نشان دادند، اما هیچ کدام قادر به حذف کامل بیوفیلم بعد از تشکیل آن نبودند، هرچند میزان آن را حدود ۴۰ درصد کاهش دادند.

در بین دهان‌شویه‌های مورد مطالعه، پرسیکا بیشترین اثر را در مهار رشد و کاهش اتصال استرپتوکوک‌ها نشان داد. این اثر بیشتر دهان‌شویه پرسیکا ممکن است به خاطر ماده تشکیل دهنده آن باشد. همان طور که قبلاً ذکر شد این دهان‌شویه حاوی عصاره چوب مسواک است که این گیاه یکی از گیاهان دارویی مؤثر در زمینه بیماری‌های دهان و دندان است که اولین بار توسط پیغمبر اسلام (ص) در ۱۴۰۰ سال قبل به مسلمانان توصیه شده است. قسمت‌های مختلف گیاه مسواک به علت دارا بودن ترکیباتی مانند تانن، ترکیبات گوگردی و ترکیبات ایزوتیوسیانایید، دارای اثر ضد میکروبی قوی و گسترده بر روی انواع میکروارگانیسم‌ها می‌باشد (۴۶).

با توجه به ویژگی‌هایی که ترکیبات طبیعی در کاهش اتصال و تشکیل بیوفیلم دارند، می‌توان از این ترکیبات برای پیشگیری و کنترل پوسیدگی دندان استفاده کرد. همچنین در مقایسه‌ای که بین این ترکیبات طبیعی با دهان‌شویه‌های گیاهی انجام شد، نتایج نشان داد که عسل و سرکه دارای اثرات مشابهی با این دهان‌شویه‌ها در کاهش اتصال می‌باشند.

در مورد اثر ترکیبات طبیعی در مهار رشد استرپتوکوک‌ها، نتایج نشان داد که تنها سرکه، اثر مهاری بر رشد این باکتری‌ها دارد که در مقایسه با دهان‌شویه‌ها از این

نظر بهتر از دهان‌شویه‌ها عمل می‌کند. در مورد کاربرد بالینی این ترکیبات در مورد پوسیدگی دندان مطالعات بیشتری مورد نیاز است.

با توجه به نتایج به دست آمده از این مطالعه، بررسی و مطالعات بیشتر در مورد اثرات ضد میکروبی عسل، گلاب و سرکه به ویژه تأثیر عوامل جنبی نظیر pH، انجام کارآزمایی بالینی در مورد اثر ترکیبات طبیعی مذکور در مهار پیشرفت و کنترل پوسیدگی دندان و بررسی اثر آن‌ها بر عوامل بیماری‌زای بیماری‌های پریودنتال به صورت in vitro و in vivo پیشنهاد می‌گردد. در مورد سرکه، استفاده از آن به شکل دارویی مناسب یا جزیی از دهان‌شویه به نحوی که بی‌ضرری آن اثبات شود تأکید می‌شود.

نتیجه‌گیری

در این تحقیق اثر گلاب، سرکه و عسل به عنوان ترکیبات طبیعی بر باکتری‌های عامل پوسیدگی دندان و پلاک دندانی مورد بررسی قرار گرفت که نتایج، مؤثر بودن این ترکیبات به ویژه سرکه و در مرحله بعد عسل در کاهش اتصال استرپتوکوک‌ها نشان داد. در نتیجه استفاده از این ترکیبات از طریق کاهش اتصال استرپتوکوک‌ها می‌تواند در پیشگیری و کنترل پوسیدگی دندان مؤثر باشد. تعیین میزان و نحوه استفاده مؤثر و بی‌ضرر، نیازمند مطالعات بیشتر است.

References

1. Marcotte H, Lavoie MC. Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A. Microbiol Mol Biol Rev 1998; 62(1): 71-109.
2. Lee DK, Park SY, An HM, Kim JR, Kim MJ, Lee SW, et al. Antimicrobial activity of Bifidobacterium spp. isolated from healthy adult Koreans against cariogenic microflora. Arch Oral Biol 2011; 56(10): 1047-54.
3. Roberson T, Heymann HO, Swift E Jr. Sturdevant's art and science of operative dentistry. Philadelphia, PA: Elsevier Health Sciences; 2006.
4. Karpinski TM, Szkaradkiewicz AK. Microbiology of dental caries. Journal of Biological Research 2013; 3(1): M21-M24.
5. Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB. Dental caries. Lancet 2007; 369(9555): 51-9.
6. Taubman MA, Nash DA. The scientific and public-health imperative for a vaccine against dental caries. Nat Rev Immunol 2006; 6(7): 555-63.
7. Anusavice KJ. Present and future approaches for the control of caries. J Dent Educ 2005; 69(5): 538-54.
8. Jeon JG, Rosalen PL, Falsetta ML, Koo H. Natural products in caries research: current (limited) knowledge, challenges and future perspective. Caries Res 2011; 45(3): 243-63.
9. Signoretto C, Canepari P, Stauder M, Vezzulli L, Pruzzo C. Functional foods and strategies contrasting bacterial adhesion. Curr Opin Biotechnol 2012; 23(2): 160-7.
10. Palombo EA. Traditional medicinal plant extracts and natural products with activity against oral bacteria: potential application in the prevention and treatment of oral diseases. Evid Based Complement Alternat Med 2011; 2011.
11. Badria FA, Zidan OA. Natural products for dental caries prevention. J Med Food 2004; 7(3): 381-4.
12. Chung JY, Choo JH, Lee MH, Hwang JK. Anticariogenic activity of macelignan isolated from Myristica fragrans (nutmeg) against Streptococcus mutans. Phytomedicine 2006; 13(4): 261-6.
13. Smullen J, Koutsou GA, Foster HA, Zumbe A, Storey DM. The antibacterial activity of plant extracts containing polyphenols against Streptococcus mutans. Caries Res 2007; 41(5): 342-9.
14. Ofek I, Hasty DL, Sharon N. Anti-adhesion therapy of bacterial diseases: prospects and problems. FEMS Immunol Med Microbiol 2003; 38(3): 181-91.
15. Cegelski L, Marshall, Eldridge GR, Hultgren SJ. The biology and future prospects of antivirulence therapies. Nat Rev Microbiol 2008; 6(1): 17-27.
16. Okamoto M, Leung KP, Ansai T, Sugimoto A, Maeda N. Inhibitory effects of green tea catechins on protein tyrosine phosphatase in Prevotella intermedia. Oral Microbiol Immunol 2003; 18(3): 192-5.
17. Shmuely H, Ofek I, Weiss EI, Rones Z, Houri-Haddad Y. Cranberry components for the therapy of infectious disease. Curr Opin Biotechnol 2012; 23(2): 148-52.

18. Daglia M, Tarsi R, Papetti A, Grisoli P, Dacarro C, Pruzzo C, et al. Antiadhesive effect of green and roasted coffee on Streptococcus mutans' adhesive properties on saliva-coated hydroxyapatite beads. J Agric Food Chem 2002; 50(5): 1225-9.
19. Stauder M, Papetti A, Mascherpa D, Schito AM, Gazzani G, Pruzzo C, et al. Antiadhesion and antibiofilm activities of high molecular weight coffee components against Streptococcus mutans. J Agric Food Chem 2010; 58(22): 11662-6.
20. Papetti A, Pruzzo C, Daglia M, Grisoli P, Bacciaglia A, Repetto B, et al. Effect of barley coffee on the adhesive properties of oral streptococci. J Agric Food Chem 2007; 55(2): 278-84.
21. Stauder M, Papetti A, Daglia M, Vezzulli L, Gazzani G, Varaldo PE, et al. Inhibitory activity by barley coffee components towards Streptococcus mutans biofilm. Curr Microbiol 2010; 61(5): 417-21.
22. Danielsson Niemi L, Hernell O, Johansson I. Human milk compounds inhibiting adhesion of mutans streptococci to host ligand-coated hydroxyapatite in vitro. Caries Res 2009; 43(3): 171-8.
23. Johansson I, Lif HP. Milk and oral health. Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program 2011; 67: 55-66.
24. Rayshahri M. Encyclopedia of medical hadiths. Trans. Khoshnasib M, Sobhaninia MT, Ofoghi R, Saadatfar A. Qom, Iran: Darolhadith Institute; 2012. [In Persian].
25. Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Švabic-Vlahovic M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. Journal of Microbiological Methods 2000; 40(2): 175-9.
26. Tahmourespour A, Kasra-Kermanshahi R, Salehi R, Nabi-nejad A. The effect of lactobacillus fermentum ATCC9338 as a probiotic on the adhesion of oral streptococci in vitro. Iran J Med Microbiol 2008; 2(1): 45-51. [In Persian].
27. Haghighati F, Jafari S, Momen Beitollahi J. Comparison of antimicrobial effects of ten Herbal extracts with chlorhexidine on three different oral pathogens; an in vitro study. Hakim Res J 2003; 6(3): 71-6. [In Persian].
28. English HK, Pack AR, Molan PC. The effects of manuka honey on plaque and gingivitis: a pilot study. J Int Acad Periodontol 2004; 6(2): 63-7.
29. Atwa AD, AbuShahba RY, Mostafa M, Hashem MI. Effect of honey in preventing gingivitis and dental caries in patients undergoing orthodontic treatment. Saudi Dent J 2014; 26(3): 108-14.
30. Patel HR, Krishnan CGA, Thanveer K. Antimicrobial effect of honey on Streptococcus mutans – An in vitro study. International Journal of Dental Science and Research 2013; 1(2): 46-9.
31. Nassar HM, Li M, Gregory RL. Effect of honey on Streptococcus mutans growth and Biofilm formation. Appl Environ Microbiol 2012; 78(2): 536-40.
32. Ahmadi-Motamayel F, Hendi SS, Alikhani MY, Khamverdi Z. Antibacterial activity of honey on cariogenic bacteria. J Dent (Tehran) 2013; 10(1): 10-5.
33. Badet C, Quero F. The in vitro effect of manuka honeys on growth and adherence of oral bacteria. Anaerobe 2011; 17(1): 19-22.
34. Ramazanalizadeh F. Antimicrobial activity of bovine colostrum against Streptococcus mutans [MSc Thesis]; Isfahan, Iran: School of Sciences, University of Isfahan; 2011. [In Persian].
35. Komiyama EY, Back-Brito GN, Balducci I, Koga-Ito CY. Evaluation of alternative methods for the disinfection of toothbrushes. Braz Oral Res 2010; 24(1): 28-33.
36. Ismael NF. "Vinegar" as anti-bacterial biofilm formed by *Streptococcus pyogenes* isolated from recurrent tonsillitis patients, *in vitro*. Jordan Journal of Biological Sciences 2013; 6(3): 191-7.
37. Jafari AA, Falah Tafti A, Lotfi Kamran MH, Zahraeii A, Kazemi A. Vinegar as a removing agent of Candida Albicans from acrylic resin plates. Jundishapur J Microbiol 2012; 5(2): 388-92.
38. Thimothe J, Bonsi IA, Padilla-Zakour OI, Koo H. Chemical characterization of red wine grape (Vitis vinifera and Vitis interspecific hybrids) and pomace phenolic extracts and their biological activity against Streptococcus mutans. J Agric Food Chem 2007; 55(25): 10200-7.
39. Kohanteb PSG, Danaei M, Vahedi R. Comparison of the antibacterial effects of persica and Matrica, two herbal mouthwashes with chlohexidine mouthwash. Shiraz Univ Dent J 2005; 6(1-2): 63-72. [In Persian].
40. Paknezhad M, Jafarzadeh Kashi TS, Shamlou AM. Comparison of the efficacy of matrica and %0.2 chlorhexidine mouthwashes on 3-6 mm pockets in patients with chronic periodontitis. Majallah-I-Dandanpizishki 2006; 18(3): 92-7. [In Persian].
41. Fallahzadeh H, Moeintaghavi A, Foruzanmehr M. Clinical comparison of persica and Chlorhexidine mouthrinses using meta – analysis technique. Majallah-I-Dandanpizishki 2006; 18(1): 62-7. [In Persian].
42. Ghasemi M, Rahbar M, Valaei N. Comparison of the substantivity of several mouthwashesand their effect on microbial plaque using Epifluorescence microscope. Majallah-I-Dandanpizishki 2014; 26(1): 59-65. [In Persian].
43. Amooian B, Silakhori M. Efficacy of persica mouthwash on plaque-induced gingivitis. J Babol Univ Med Sci 2004; 6(5): 7-11. [In Persian].

44. Atai Z, Abdollahi H, Naderipour S, Mohammadi S. Comparison of antifungal and antibacterial effects of persica Matrica and Iralwex with Chlorhexidine mouthwashes (in vitro study). J Dent Sch Shahid Beheshti Univ Med Sci 2007; 25(1): 58-65. [In Persian].
45. Abed M, Ketabi M. Efficacy of chlorhexidine and persica reduce chronic inflammation of the gums. Proceedings of the 40th Annual Scientific Congress of Iranian Dental Association; 2000 Apr 11-14; Tehran, Iran. [In Persian].
46. Salehi MH. Medicinal properties Salvadora persica. Journal of Nutrition world 2008; 7(81): 72-5. [In Persian].

Evaluation of the effects of honey, vinegar and rosewater on adhesion and biofilm formation of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*

Nayere Jebali[1]
Mohammad Rabbani Khorasgani[2]
Mehrnaz Kianfar[3]
Hamid Emami[4]

1. MSc, Microbial Biotechnology , Department of Biotechnology, School of New Sciences and Technology, University of Isfahan, Isfahan, Iran.
2. **Corresponding Author:** Associate Professor, Department of Biology, School of New Sciences and Technology, University of Isfahan, Isfahan, Iran. **Email:** m.rabbani@biol.ui.ac.ir
3. Associate Professor, Department of Biotechnology, School of New Sciences and Technology, University of Isfahan, Isfahan, Iran.
4. Lecturer, Department of Biology, School of New Sciences and Technology, University of Isfahan, Isfahan, Iran

Abstract

Introduction: Evidence indicates the role of mutans streptococci (especially Streptococcus mutans and Streptococcus sobrinus) and Lactobacilli in initiation and development of dental caries. The aim of this study was to investigate the effects of some natural compounds on biofilm formation and growth of Streptococcus mutans and Streptococcus sobrinus and compare their effects with three herbal mouthwash products.

Materials & Methods: In this laboratory study, natural products (honey, vinegar and rosewater) and two strains of Streptococcus (S. mutans, S. sobrinus) were used. First the adherence and biofilm formation of the pathogenic strains were investigated and then the effects of natural products on adhesion of pathogens was evaluated. In both teats, microtiter plate assay was used. In addition, the inhibitory effects of these compounds on the growth of Streptococci were investigated. Finally, the effects of these compounds were compared with those of three herbal mouthwash products. Data were analyzed with SPSS 15 using independent-samples test and Excel software program. Statistical significance was defined at p value < 0.05.

Results: S. mutans and S. sobrinus expressed strong (OD=2.5) and moderate (OD=1.53) adherence, respectively. Vinegar, rosewater and honey reduced biofilm formation by Streptococcus mutans up to 66.45%, 66.18% and 66.43%, respectively. Comparison of natural compounds and herbal mouthwash products showed that the three mouthwashes did not have significant differences (p value < 0.05) in reducing pathogen binding. Rosewater was less effective than the other compounds in the reduction of pathogen binding. The results indicated that vinegar and the three mouthwashes had inhibitory effects on the growth of Streptococci.

Conclusion: Observations showed that these natural compounds, particularly vinegar and then honey, were able to reduce biofilm formation by cariogenic pathogens. Therefore, use of these compounds can be effective in preventing and controlling dental caries by reducing the binding of Streptococci.

Key words: Dental caries, Streptococcus mutans, Streptococcus sobrinus, Biological products, Herbal oral rinse.

Received: 8.4.2016 **Revised**: 2.9.2016 **Accepted:** 6.9.2016

How to cite: 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): 232-247.