Archive of SID

تحقیقی

مجله دندانپزشکی جامعه اسلامی دندانپزشکان/ دوره ۲۷، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۴، ۱۱۷-۱۱۰

اثرات ضدمیکروبی گلاب و سرکه انار در مقایسه با دهان‌شویه گیاهی پرسیکا بر باکتری‌های دهانی در آزمایشگاه

فاطمه رمضانعلی‌زاده[۱]- دکتر محمد ربانی[۲]- دکتر مریم خروشی[۳]-اعظم علی اصغری[۱]

۱- کارشناس ارشد گروه آموزشی زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

۲- دانشیار گروه آموزشی زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

۳- استاد گروه آموزشی دندانپزشکی ترمیمی دانشکده دندانپزشکی و مرکز تحقیقات مواد دندانی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

چکیده

زمینه و هدف: *سالهاست استرپتوکوک‌های گروه موتانس از عوامل اصلی پوسیدگی دندان شمرده می‌شوند. کاربرد برخی از مواد طبیعی به عنوان دهان‌شویه در کاهش این باکتری‌ها مؤثر بوده است. در این مطالعه با هدف تعیین اثرات ضد میکروبی گلاب و سرکه انار در مقایسه با دهان‌شویه پرسیکا علیه دو باکتری مؤثر در پوسیدگی دندان انجام شد.*

روش بررسی: *در این مطالعه آزمایشگاهی سویه‌های شدیداً چسبنده S. mutans و S. Sobrinus انتخاب شدند. اثر ضد میکروبی گلاب و سرکه انار بر روی جمعیت بیوفیلم و قدرت چسبندگی این باکتری‌ها به روش میکروتیتر پلیت مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین برای بررسی اثر این مواد روی قدرت رشد باکتری‌ها از روش چاهک گذاری استفاده گردید. اطلاعات به دست آمده توسط آزمون One way ANOVA و آزمون Tukey Post Hoc در نرم افزار Graph Pad Prism ویرایش ۵ و در سطح اطمینان ۰/۹۵ تجزیه و تحلیل شد.*

یافته‌ها: *میزان کاهش تشکیل پلاک توسط سرکه انار ، گلاب و پرسیکا در مورد Streptococcus mutans به ترتیب ۹۳٪ ، ۸۰٪ ، ۶۸٪ و در مورد Steptococcus sobrinus نیز به ترتیب ۹۲٪ ، ۵۷٪ و ۴۸٪ بود. که هر سه مواد باعث کاهش اتصال این دو باکتری شدند. ($p <$ ۰/۰۰۱)، همچنین نشان داده شد که سرکه نسبت به دو ماده دیگر مؤثرتر عمل می‌کند. ($p <$ ۰/۰۰۱)، بر خلاف این تاثیر، این مواد قادر به حذف بیوفیلم نبودند. سرکه انار و دهان‌شویه گیاهی پرسیکا بر روی قدرت رشد باکتری‌ها تاثیر منفی داشتند.*

نتیجه‌گیری: *با توجه به محدودیتهای این مطالعه، به نظر می‌رسد که سرکه انار و گلاب توانایی بالقوه استفاده برای مقابله و کنترل باکتری‌های مؤثر در پوسیدگی دندان (استرپتوکوکوس موتانس و استرپتوکوکوس سوبرینوس) را دارند.*

کلید واژه‌ها: *پوسیدگی دندان ، دهان‌شویه‌ها ، استرپتوکوک‌ها ، استرپتوکوک موتان*

وصول مقاله: ۱۳۹۳/۱۲/۲۸ اصلاح نهایی: ۱۳۹۴/۵/۱۲ پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۶/۲۴

نویسنده مسئول: دکتر محمد ربانی، گروه آموزشی زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

e.mail:m.rabbani@biol.ui.ac.ir

مقدمه

گرایش جامعه جهت استفاده از مواد طبیعی برای درمان بیماریها موجب شده است که غربالگری مواد به دست آمده از گیاهان مورد توجه محققان قرار بگیرد. از آنجایی که تقریباً پانصد هزار گونه گیاهی در جهان وجود دارد که فقط ۱٪ آنها از نظر فیتوشیمیایی بررسی شده‌اند توان زیادی برای کشف ترکیبات زیست فعال وجود دارد. (۱)، هر چند مقالات متعددی در مجلات داخلی و خارجی در مورد اثر ضد میکروبی عصاره‌های مختلف گیاهان دارویی وجود دارد اما مطالعه در مورد اثر گیاهان دارویی بر عوامل بیماریزای دهانی اندک است.

پوسیدگی دندان یکی از بیماریهای عفونی رایج در میان انسانهاست که در گروههای دارای موقعیت اقتصادی پایین بیشتر وجود دارد. (۲)، درمان این بیماری نیازمند صرف وقت و هزینه‌های بالای درمانی است. با توجه به شیوع گسترده این بیماری و در عین حال به خاطر افزایش مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها، همچنین اثرات نامطلوب بعضی از مواد شیمیایی استفاده شده در دندانپزشکی و نیز هزینه‌های بالای کاربرد آنها نیاز به مواد جایگزین طبیعی که سالم و از نظر اقتصادی مقرون به صرفه باشند برای جلوگیری از پوسیدگی دندان وجود دارد. مواد شیمیایی موجود میکروبیوتای دهانی

www.SID.ir

Archive of SID

را تغییر می‌دهند و گاه عوارضی مثل اسهال، استفراغ و رنگ شدن دندانها را در پی دارند. (۳،۱)

استرپتوکوک‌های گروه موتانس از جمله Streptococcus mutans و Streptococcus sobrinus با قدرت تشکیل بیوفیلم بالا به عنوان عوامل اصلی ایجاد این بیماری شناخته شده‌اند.

این باکتری‌ها در اولین مرحله ایجاد پوسیدگی، به مینای دندان متصل می‌شوند و سپس با مصرف قند سوکروز موجود در وعده‌های غذایی تولید گلوکان می‌کنند که موجب تجمع آنها در جوامع بیوفیلمی می‌شود و در نهایت با تولید اسید مینای دندان را تخریب می‌کنند. (۴)، با توجه به اینکه اتصال و چسبندگی اولین قدم و زمینه ساز رشد باکتری برای ایجاد پوسیدگی دندان است امروزه چسبندگی هدفی مناسب برای درمانهای جدیدی است که برای مهار کلونیزاسیون این باکتری‌ها طراحی شده است. (۳)

در این زمینه علاوه بر مطالعه در مورد دستیابی به ترکیبات جدید برضد عوامل بیماری‌زای دهانی اثر داروهای گیاهی که در سیستم‌های سنتی گزارش شده‌اند مورد بررسی دقیق قرار می‌گیرد. بخش قابل توجهی از مطالعات موجود در مورد تاثیر ترکیبات، به دو دسته تقسیم می‌شود، دسته اول به بررسی اثر فعالیت مواد طبیعی به ویژه گیاهان یا عصاره‌های گیاهی و مواد فیتوشیمیایی خالص شده، بر ضد رشد پاتوژن‌های اختصاصی دهان می‌پردازد و دسته دوم به بررسی توانایی این‌محصولات در مهار تشکیل بیوفیلم‌های دهانی از طریق کاهش اتصال میکروبی به سطوح دندان که مرحله پیشگام درتشکیل پلاک دندانی است می‌پردازد. (۵)، اگر فرآورده‌ای توانایی این را داشته باشد که هم چسبندگی و هم رشد باکتری را مهار کند از کارآمدی فوق‌العاده‌ای برای مهار پوسیدگی دندان برخوردار است.

از جمله مواد طبیعی توجه شده در طب سنتی برای مقابله با پوسیدگی دندان گلاب و سرکه است که در مطالعه حاضر از آنها استفاده شده است.

گلاب ماده‌ای معطر است که از گل محمدی با نام علمی Rosa damascena Mill. از خانواده Rosaceae به دست می‌آید. (۶)، گل محمدی گیاهی است که در شرایط آب و هوایی مختلف و بسیار سخت از جمله خاک نامرغوب و سخت، کم آبی و شیب زیاد زمین رویش دارد. (۷)، گلاب در ایران به فراوانی تولید می‌شود و به نقاط مختلف دنیا صادر می‌گردد. گلاب گل محمدی کاربردهای درمانی فراوانی دارد و به عنوان یک داروی گیاهی برای بیماریهای مختلف از جمله ضایعات پوستی (۸) پیشنهاد شده است. از گلاب در صنعت مواد آرایشی، برای تولید انواع کرم‌های مرطوب کننده و تمیز کننده صورت استفاده می‌شود. (۹)، با توجه به فراوانی این ماده در کشور، در صورت اثبات اثر ضد میکروبی آن بر باکتری‌های دهانی می‌توان از گلاب در دهان‌شویه‌ها به عنوان ماده‌ای مؤثر برای کنترل پوسیدگی دندان استفاده کرد. بنابراین در این مطالعه برای اولین بار اثر این ماده گیاهی روی اصلیترین باکتری‌های عامل پوسیدگی دندان در آزمایشگاه بررسی شد.

سرکه ماده طبیعی دیگری است که در طب سنتی ایران بسیار به آن اشاره شده است. قدمت تولید سرکه حداقل به چهار هزار سال قبل از میلاد می‌رسد و فرایند تولید آن به لحاظ فیزیولوژیک نوعی واکنش اکسیداسیون ناقص است. (۱۰)، در روند تولید سرکه ابتدا مخمرها قند موجود در مواد را به الکل و سپس باکتری‌های اسیداستیک (استوباکتر) الکل را به اسیداستیک تبدیل می‌کنند. (۱۱)، سرکه اثرات متعددی مانند افزایش انباشتگی گلیکوژن، جلوگیری از افزایش فشارخون، تحریک جذب کلسیم، کاهش کلسترول و تری اسیل گلیسرول کلی سرم دارد که در مطالعات حیوانی نشان داده شده است. (۱۲)

استفاده از سرکه برای مبارزه با عفونت و سایر شرایط حاد به زمان بقراط بر می‌گردد که تجویز سرکه برای تمیز کردن زخم و درمان آن توصیه می‌شده است. (۱۱)، سرکه انواع مختلفی دارد، در این مطالعه اثر سرکه انار بر ضد باکتری‌های دهانی مورد بررسی قرار گرفت. محققان اثر ضد میکروبی خود گیاه انار و قسمتهای مختلف آن را بر ضد باکتری‌های دهانی نشان‌داده‌اند اما تاکنون به اثر سرکه آن در هیچ تحقیقی اشاره نشده است.

در تحقیقی اثر ضد میکروبی پوست انار برابر با اثر اسید – تانیک ۶۰٪ بر ضد باکتری‌های دهانی ذکر شده است.

Haghighati و همکاران اثر ضد میکروبی عصاره پوست انار را بر مهار رشد باکتری‌های دهانی نشان دادند. (۱۳)، در تحقیقی دیگر محققان برزیلی اثر عصاره انار را بر ضد ویژگی اتصال و چسبندگی باکتری‌های دهانی (یعنی اولین قدم برای ایجاد این بیماری) نشان دادند. (۱۴)

دهان‌شویه گیاهی پرسیکا حاوی عصاره گیاهان سالوادورا پرسیکا، نعنا و بومادران است. در چندین مطالعه اثرات ضد میکروبی، ضد پلاک و ضد پوسیدگی گیاه سالوادورا تحت

www.SID.ir

Archive of SID

عنوان مسواک (Miswak) گزارش شده است. (۱۵-۱۷)، با توجه به این که دهان‌شویه پرسیکا حاوی مواد طبیعی و به صورت یک محصول تجاری وارد بازار شده است برای مقایسه با مواد طبیعی مورد بررسی، در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت.

با توجه به اینکه در طب سنتی کشور ایران به استفاده از گلاب و سرکه برای مقابله با پوسیدگی دندان توصیه شده است و همچنین با علم به اینکه تا به حال اثر ضد میکروبی این دو ماده گیاهی بر رشد و چسبندگی استرپتوکوک‌های دهانی بررسی نشده است، این مطالعه با هدف تعیین تاثیر ضد میکروبی این مواد علیه باکتری‌های عامل پوسیدگی دندان انجام گرفت. همچنین تاثیر این مواد با نوعی دهان‌شویه گیاهی رایج به نام پرسیکا مقایسه شد.

روش بررسی

در این مطالعه آزمایشگاهی پس از نمونه‌گیری پنج سویه Streptococcus mutans از پوسیدگی دندان و پلاک دندان افراد داوطلب توسط کورت استریل دندانپزشکی جداسازی گردید. دو سویه استاندارد Streptococcus mutans ATCC35668 و Streptococcus sobrinus ATCC 27607 نیز از سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران به صورت لیوفیلیزه خریداری گردید. تهیه سوسپانسیون از پودر لیوفیلیزه صورت گرفت. همه سویه‌ها در محیطهای کشت آگار خوندار (BA) و میتیس سالیواریوس آگار (MSA) کشت داده شد و در انکوباتور CO2 دار (۵٪) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. سوشهای استاندارد بعد از رشد در مجاورت با دیسک باسیتراسین و اپتوچین، رنگ‌آمیزی گرم و تست کاتالاز در مورد آنها انجام و تایید نهایی شدند.

تعیین کمیت تشکیل بیوفیلم توسط باکتری‌ها به روش میکرو-تیتر پلیت

روش میکروتیتر پلیت بر مبنای رنگ سنجی است که برای تعیین قدرت تشکیل بیوفیلم باکتری‌ها و همچنین سنجش اثر عوامل ضد میکروبی بر روی بیوفیلم مورد استفاده قرار می‌گیرد. این روش نیاز به محیط کشت کمی دارد، وقت گیر نمی‌باشد و می‌توان از آن برای سنجش قدرت ضد میکروبی طیف وسیعی از عوامل ضد میکروبی با غلظتهای مختلف و همچنین در ترکیب با هم استفاده کرد. (۱۸- ۱۹)

برای سنجش قدرت تشکیل بیوفیلم توسط باکتری‌های موجود، کشت ۱۸ تا ۲۴ ساعته از هر باکتری در محیط کشت تریپتوز سوی براث (TSB) کامل شده با ۱٪ سوکروز و ۵٪ CO_2 تهیه گردید. سپس رقیق‌سازی این سوسپانسیون میکروبی با محیط TSB استریل برای تهیه کدورتی معادل نیم مک فارلند صورت گرفت. از سوسپانسیون تهیه شده دویست و پنجاه میکرولیتر به هشت چاهک پلیت ۹۶ چاهکی پلی استیرن انتقال داده شد. چاهکهای شاهد تنها حاوی محیط کشت استریل بودند. پس از ۲۴ ساعت محتویات چاهکها خارج و هر چاهک سه مرتبه با سیصد میکرولیتر سرم فیزیولوژی استریل شسته شد. در مرحله بعد باکتری‌های متصل به دیواره و کف چاهک با دویست و پنجاه میکرولیتر اتانول ۹۶٪ تثبیت شدند، بعد از گذشت ۱۵ دقیقه محتویات چاهکها تخلیه و پلیت‌ها در دمای آزمایشگاه خشک گردیدند. در این مرحله رنگ‌آمیزی آنها با کریستال ویوله ۲٪ به مدت پنج دقیقه انجام گرفت و بعد از شستشوی رنگ اضافی با آب، پلیت‌ها در دمای آزمایشگاه خشک شدند و با اضافه کردن دویست میکرولیتر اسید استیک گلایسال ۳۳٪ به هر چاهک سنجش کمی از طریق جذب نوری رنگ کریستال ویوله موجود در حلال رنگ بر در طول موج ۴۹۲ نانومتر توسط دستگاه خواننده الایزا ارزیابی شد. در نهایت کلاس‌بندی سویه‌های باکتریایی بر اساس جذب نوری (OD) به صورت زیر انجام گرفت. (۲۰)

OD: میانگین جذب نوری یک باکتری

ODc: میانگین جذب نوری چاهکهای شاهد

$OD \leq ODc$: غیر چسبنده

$ODc < OD \leq 2OD$: چسبندگی ضعیف

$2ODc < OD \leq 4ODc$: چسبندگی متوسط

$4ODc < OD$: شدیداً چسبنده

سپس سویه‌های شدیداً چسبنده که قدرت تشکیل بیوفیلم آنها از بقیه بیشتر بود برای مراحل بعد انتخاب شدند.

تعیین توانایی گلاب، سرکه انار و دهان‌شویه پرسیکا در حذف بیوفیلم

در این مرحله از روش میکروتیتر پلیت استفاده شد. بعد از آماده‌سازی کشت ۱۸-۲۰ ساعته از سویه‌های شدیداً چسبنده در TSB کامل شده با ۱٪ سوکروز از هر کدام از سویه‌ها سوسپانسیون میکروبی معادل نیم مک فارلند تهیه شد. سپس این سوسپانسیون به نسبت یک به صد در TSB استریل رقیق شد و تمام چاهکها در یک پلیت ۹۶ خانه‌ای پلی استیرن با

www.SID.ir

Archive of SID

دویست و پنجاه میکرولیتر از این محیط پر شدند. چاهکهای شاهد تنها حاوی محیط مایع بودند. بعد از تلقیح، سطح پلیت‌ها پوشیده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ CO_2 انکوبه شدند بعد از گذشت این مدت زمان و خارج کردن محتویات چاهکها شستشوی آنها با سیصد میکرولیتر سرم فیزیولوژی استریل صورت گرفت و بلافاصله دویست و پنجاه میکرولیتر سرکه و گلاب استریل شده با فیلتر سر سرنگی میلی پور ۰/۲ و دهان‌شویه گیاهی پرسیکا به مدت یک ساعت به کار گرفته شدند.

هر هشت چاهک در یک ردیف تیمار مشابهی داشتند و هر بیست دقیقه یک بار مواد ضد میکروبی تازه جایگزین می‌شد. علاوه بر این ستونهای کنترل حاوی بیوفیلم بدون تیمار، در هر پلیت وجود داشت. بعد از گذشت یک ساعت عوامل ضد میکروبی به وسیله شستن چاهکها خارج شدند. سپس چاهکها با دویست میکرولیتر کریستال ویوله ۲٪ به مدت پنج دقیقه رنگ‌آمیزی شدند و بعد از شستشو با دویست میکرولیتر اسید استیک گلایسال ۳۳٪ پر شدند. در مرحله بعدی ۱۵ دقیقه روی شیکر به شدت تکان داده شدند و جذب نوری آنها در طول موج ۴۹۲ نانومتر توسط دستگاه خواننده الایزا خوانده شد. در ادامه سنجش کارآیی این مواد با درصد کاهش بیوفیلم از طریق جذب نوری چاهکهای تیمار شده و کنترل و شاهد توسط فرمول زیر محاسبه گردید. (۲۱)

$$\text{درصد کاهش بیوفیلم} = \left(\frac{(C-B)-(T-B)}{(C-B)}\right) \times ۱۰۰$$

C: میانگین جذب نوری چاهکهای کنترل

B: میانگین جذب نوری چاهکهای شاهد

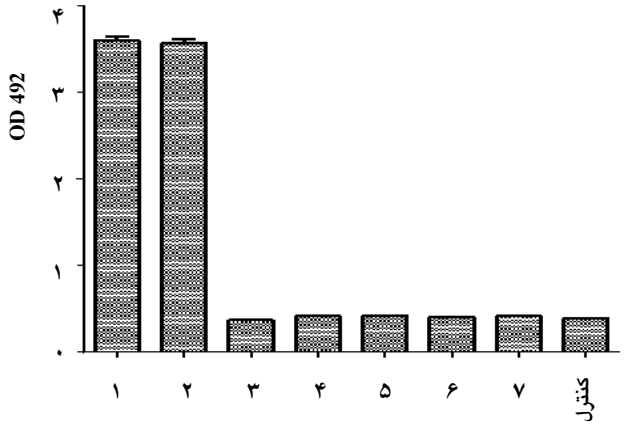
T: میانگین جذب نوری چاهکهای تیمار شده

تاثیر گلاب، سرکه انار و دهان‌شویه پرسیکا بر اتصال باکتری‌های دارای قدرت اتصال زیاد

کشت شبانه استرپتوکوک‌های با قدرت اتصال بالا در محیط TSB کامل شده با ۱٪ سوکروز تهیه شد. برای بررسی نقش ترکیبات مورد بررسی در ممانعت از اتصال باکتری‌ها، از دو روش استفاده گردید:

روش اول دویست میکرولیتر از مخلوط هم حجم از عوامل ضد میکروبی و باکتری‌ها به چاهکها منتقل شد و چاهکهای شاهد فقط حاوی سوسپانسیون میکروبی بودند.

در روش دیگر ابتدا صد میکرولیتر از گلاب، سرکه انار و دهان‌شویه گیاهی پرسیکا وارد چاهکها شده و سی دقیقه بعد سوسپانسیون استرپتوکوک‌ها اضافه گردید. در چاهکهای شاهد این مرحله ابتدا صد میکرولیتر PBS و پس از سی دقیقه صد میکرولیتر استرپتوکوک اضافه شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، محلولها و مواد غذایی از چاهکها خارج و سه بار شستشو با PBS انجام و با کریستال ویوله ۲٪ به مدت پنج دقیقه رنگ‌آمیزی انجام گردید. پس از افزودن اسید استیک ۳۳٪ جذب نوری حلال رنگ بر توسط دستگاه الایزا خوانده شد و با مقایسه با چاهکهای شاهد درصد کاهش اتصال باکتری‌ها از طریق کاهش میزان جذب نوری محاسبه گردید. (۲۲) (نمودار ۱)



نمودار ۱: میانگین سه بار تکرار جذب نوری سویه‌های استرپتوکوک مورد مطالعه (به منظور تعیین قدرت تشکیل بیوفیلم استرپتوکوک‌های دهانی)

بررسی اثر گلاب، سرکه انار و دهان‌شویه پرسیکا بر قدرت رشد باکتری‌ها

در این مرحله از روش چاهک‌گذاری برای بررسی اثر ضد میکروبی این مواد استفاده شد. (۸)، بعد از کشت ۱۸-۲۰ ساعته از Streptococcus mutans و Streptococcus sobrinus در محیط کشت آبگوشت عصاره مغز و قلب (BHIB)، از هر کدام از باکتری‌ها سوسپانسیون میکروبی معادل کدورت نیم مک فارلند تهیه شد. سوآپ استریل در این لوله فروبرده شد و روی محیط مولر هینتون آگار کامل شده با ۵٪ خون دفیبرینه گوسفند در سه جهت با زاویه شصت درجه کشت داده شد.

پلیت‌های تلقیح شده به مدت ۳-۵ دقیقه روی سطح صاف نگهداری شدند در ادامه به کمک قسمت انتهایی یک پیپت پاستور استریل حفره‌های یکسانی به قطر شش میلی‌متر روی محیط ایجاد و در هر چاهک یک قطره از محیط مولر هینتون آگار مذاب ریخته شد تا ته حفره‌ها مسدود شود. در ادامه صد میکرولیتر از مواد مختلف ضدمیکروبی تهیه شده در هر حفره

www.SID.ir

Archive of SID

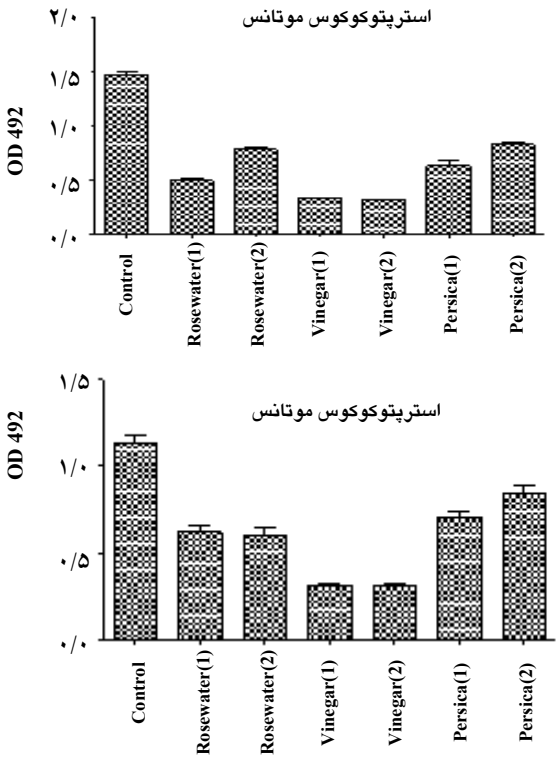
وارد گردید. از آب مقطر به عنوان شاهد منفی استفاده شد. پلیت‌ها به مدت یک ساعت در یخچال قرار داده شدند تا مواد ضد میکروبی قبل از رشد و تکثیر باکتری‌ها فرصت انتشار در محیط را داشته‌باشند. پلیت‌ها به مدت ۱۶-۲۰ ساعت گرمخانه-گذاری شدند و قطر هاله عدم رشد بعد از این مدت اندازه‌گیری گردید.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با نرم افزار SPSS ویرایش ۱۶ در مورد استرپتوکوکوس موتانس (One-Way ANOVA و Tukey Post Hoc) و برای استرپتوکوکوس سوبرینوس (Kruskal-Wallis و Mann-Whitney U) محاسبه شدند. سطح معناداری داده‌ها ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

بررسی کمیت تشکیل بیوفیلم سویه های مختلف استرپتوکوک

برای بررسی فعالیت ضد اتصالی گلاب، سرکه انار و دهان شویه پرسیکا، ابتدا کمیت تشکیل بیوفیلم سویه‌های مورد نظر مورد مطالعه قرار گرفت تا سویه‌هایی که چسبندگی بیشتری دارند برای بررسی اثر ضد اتصالی انتخاب شوند. نمودار ۲ میانگین سه بار تکرار جذب نوری باکتری‌های مورد مطالعه را نشان می‌دهد.



نمودار ۲: روند کاهش تشکیل بیوفیلم در حضور گلاب، سرکه انار و دهان شویه پرسیکا

باکتری‌های Streptococcus mutans و Streptococcus sobrinus استاندارد (باکتری شماره۱و۲) جزو سویه‌های شدیداً چسبنده بودند. باکتری‌های ۴،۵،۶و۷ جدا شده از دهان افراد، چسبندگی ضعیفی داشتند و باکتری شماره ۳ غیر چسبنده بود.

تاثیر مواد مورد مطالعه بر حذف بیوفیلم Streptococcus mutans و Streptococcus sobrinus

بررسی تاثیر گلاب، سرکه انار و دهان‌شویه پرسیکا بر کاهش بیوفیلم سویه‌های با قدرت اتصال بالا نشان‌دهنده ناتوانی عوامل ذکر شده در حذف بیوفیلم شکل گرفته توسط این باکتری‌ها بود. درصد حذف بیوفیلم در حضور سرکه انار، گلاب و پرسیکا به ترتیب در مورد Streptococcus mutans ۰/۰۸۹٪ ، ۰/۳۸٪ و ۰/۰۸۹٪ بود و در مورد Streptococcus sobrinus نیز درصد حذف بیوفیلم به ترتیب ۰/۰۶۱٪ ، ۰/۳۷٪ و ۰/۰۶۲٪ بود که از نظر آماری تفاوت‌معنی‌دار وجود نداشت. (p=۰/۵۱۴)

بررسی اثر مورد مطالعه بر قدرت اتصال باکتری‌های دارای قدرت چسبندگی زیاد

نتایج اثر گلاب، سرکه انار و پرسیکا بر قدرت اتصال S.mutans و S.sobrinus در جدول ۱ و شکل ۲ آمده است. هر سه این مواد باعث کاهش معنادار اتصال استرپتوکوکوس موتانس و استرپتوکوکوس سوبرینوس نسبت به گروه کنترل شده است. (p <۰/۰۰۱)

همان‌گونه که در این جدول مشاهده می‌شود گلاب باعث کاهش اتصال ۸۰ و ۵۶ درصدی اتصال (به ترتیب در روش اول و دوم) در مورد استرپتوکوکوس موتانس و کاهش ۵۷ و ۶۰ درصدی اتصال در مورد استرپتوکوکوس سوبرینوس شده است. که نشان می‌دهد گلاب بر ضد استرپتوکوکوس سوبرینوس تفاوت معناداری بین دو روش استفاده شده وجود ندارد. (p=۴۵۱)، همچنین تاثیر گلاب بر اتصال استرپتوکوکوس موتانس در روش دوم تفاوت معناداری با دهان‌شویه پرسیکا وجود ندارد. (p=۰/۳۱۹)، اما در مورد استرپتوکوکوس سوبرینوس روش دوم مؤثر بوده است. (p=۰/۰۰۳)

در مورد سرکه مشاهده شد که تقریباً در هر دو باکتری اجازه چسبیدن باکتری به چاهک را نداده است و بیشترین اثر را نسبت به بقیه مواد در هر دو روش مورد بررسی روی کاهش اتصال باکتری‌ها داشت (p <۰/۰۰۱) و اختلاف معنا - داری بین دو روش مورد بررسی مشاهده نشد. (p=۵۱۴)

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱: درصد کاهش اتصال باکتری‌های استرپتوکوکوس موتانس و استرپتوکوکوس سوبرینوس در حضور گلاب، سرکه و دهان‌شویه پرسیکا

ماده گیاهی	باکتری	درصد کاهش اتصال روش۱*	انحراف معیار	درصد کاهش اتصال روش۲**	انحراف معیار
گلاب	S.mutans	۸۰	۰/۰۶۳	۵۶	۰/۰۸۱
	S.sobrinus	۵۷	۰/۰۹۹	۶۰	۰/۱۵۹
سرکه انار	S.mutans	۹۳	۰/۰۱۲	۹۵	۰/۰۲۱
	S.sobrinus	۹۲	۰/۰۲۶	۹۳	۰/۰۲۸
پرسیکا	S.mutans	۶۸	۰/۱۱۳	۵۲	۰/۰۵۸
	S.sobrinus	۴۸	۰/۱۰۳	۳۲	۰/۱۱۶

* مواد ضد میکروبی و باکتری‌ها همزمان به چاهکها منتقل شدند.

** مواد ضد میکروبی سی دقیقه قبل از باکتری‌ها وارد چاهکها شدند.

دهان‌شویه گیاهی پرسیکا به میزان معنی‌داری باعث کاهش اتصال نسبت به گروه کنترل شد. (p <۰/۰۰۱)، از نظر آماری تفاوت معنی‌داری در دو روش استفاده شده در استرپتوکوکوس سوبرینوس مشاهده نشد و هر دو روش تقریباً به یک نسبت چسبندگی را درباره هر دو باکتری کاهش دادند. (p=۰/۱۰۵)

نتایج بررسی اثر مواد گیاهی بر رشد استرپتوکوک‌ها

در جدول ۲ میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری‌های استرپتو – کوکوس موتانس و استرپتوکوکوس سوبرینوس آمده است. همان‌گونه که مشاهده می‌شود گلاب قادر به ممانعت از رشد باکتری‌های استرپتوکوکوس موتانس و استرپتوکوکوس سوبرینوس نبود. چنانچه هیچ‌گونه هاله‌ای در ممانعت از رشد ایجاد نکرد. سرکه انار هاله ممانعت از رشد قابل توجهی به قطر ۱۶ و ۱۸ میلی‌متر به ترتیب در اطراف استرپتوکوکوس موتانس و استرپتوکوکوس سوبرینوس ایجاد کرد.

هاله عدم رشد استرپتوکوکوس موتانس در حضور دهان شویه پرسیکا ۱۱ میلی‌متر بود که به طور معناداری از سرکه انار کمتر بود (p<۰/۰۰۱) و در مورد استرپتوکوکوس سوبرینوس ۱۴ میلی‌متر که در این مورد هم نسبت به سرکه انار کمتر بود. (p=۰/۰۰۳)

جدول ۲: میانگین قطر هاله عدم رشد استرپتوکوکوس موتانس و استرپتوکوکوس سوبرینوس در مجاورت سرکه انار، گلاب و دهان‌شویه

نام فرآورده گیاهی	باکتری	میانگین قطر هاله عدم رشد به روش چاهک (میلی متر)	انحراف معیار
سرکه انار	S.mutans	۱۶	/۸۸۶
	S.sobrinus	۱۸	/۹۵
گلاب	S.mutans	۰	۰
	S.sobrinus	۰	۰
پرسیکا	S.mutans	۱۱	۰/۷۹
	S.sobrinus	۱۴	۱

بحث

مطالعات زیادی در زمینه اثر ضد میکروبی دهان شویه گیاهی پرسیکا در کاهش پیشگیرانه از پلاک دندانی وجود دارد و برای این ماده اثر ضد میکروبی بر ضد باکتری‌های بیماری-زای دهانی در نظرگرفته شده است. (۱۵-۱۷)، در این مطالعه اثر پرسیکا در کاهش اتصال استرپتوکوک‌های دهانی نشان داده شد که این نتیجه با مطالعات دیگران مبنی بر اثر روی باکتری‌های دهانی مطابقت دارد. از طرف دیگر برای اولین بار عدم توانایی پرسیکا در حذف بیوفیلم تشکیل شده و مهار رشد باکتری‌های دهانی مشاهده شد.

پیش از این اثر ضد میکروبی سرکه در مطالعات مختلف نشان داده شده است. از جمله Ismael با بررسی تاثیر چند نوع سرکه روی بیوفیلم ۲۹ استرپتوکوک پیوژنز جداسازی شده از بیماران، نشان دادند که سرکه باعث حذف حداقل ۹۰ درصدی بیوفیلم می‌شود. (۲۳)، Komiyama و همکاران در سال ۲۰۱۰، به بررسی اثر ضدمیکروبی و ضدعفونی‌کننده کلرهگزیدین ۰/۱۲٪ ، سرکه سفید ۰/۵۰٪ و دو ماده دیگر بر روی استرپتوکوکوس موتانس، استرپتوکوکوس پیوژنز، استافیلوکوکوس اورئوس و کاندیدا آلبیکانس بر روی مسواک

www.SID.ir

Archive of SID

پرداختند. در مورد سرکه نشان داده شد که سبب کاهش جمعیت استرپتوکوکوس موتانس، استرپتوکوکوس پیوژنز و استافیلوکوکوس اورئوس می‌شود. (۲۴)

در زمینه اثر ضدمیکروبی ترکیبات با منشاء انار تحقیقات چندی بر علیه باکتری‌های بیماری‌زای دهانی وجود دارد. از جمله در مورد عصاره گل و پوست انار بر ضد باکتری‌های بیماری‌زای دهانی مانند S.mutans توسط Haghighati و همکاران در سال ۸۲ گزارش شد. (۱۳)، در همین راستا Loo و همکاران در سال ۲۰۱۰ اثر اسید الاگیک را روی باکتری‌های دهان گزارش کردند. (۲۵)، عصاره انار حاوی حدود۴۰٪ از این اسید می‌باشد. همچنین Vasconcelos و همکاران در سال ۲۰۰۶ برای این ماده اثرات ضد میکروبی بر ضد S.mutans مشاهده کرده بودند. (۱۴)، Subramaniam و همکاران در مطالعه‌ای با مقایسه اثر ضد میکروبی عصاره انار با آلوئه‌ورا و سوربیتول نشان دادند عصاره انار اثر ضد میکروبی بیشتری در مقایسه با دو ماده دیگر روی استرپتوکوکوس موتانس دارد. (۲۶)

یافته‌های این مطالعه نشان داد که سرکه انار قابلیت ضد اتصالی و مهار رشد بالایی دارد، اگرچه بعد از تشکیل بیوفیلم قادر به حذف آن نیست. سرکه به خاطر اینکه همزمان باعث مهار رشد و اتصال می‌شود در زمینه کنترل باکتری‌های دهانی بسیار اهمیت دارد. نکته جالب توجه درباره سرکه pH اسیدی آن می‌باشد که با وجود اینکه استرپتوکوک‌های گروه موتانس خود تولید کننده اسید هستند (درواقع یکی از مکانیسم‌های آنها برای رقابت با دیگر عوامل بیماری‌زای موجود در حفره دهانی تولید اسید می‌باشد) اما توانایی زنده ماندن در حضور سرکه را ندارند. بنابراین به نظر می‌رسد با توجه به این که به اثر این ماده در طب سنتی ایران برای کنترل پوسیدگی دندان اشاره شده است و تاکنون دانشمندان به خاطر نگرانی از اثر اسید روی تخریب مینای دندان به این ماده توجه نکرده‌اند، مطالعه در زمینه مواد مؤثره مختلف موجود در این ماده طبیعی و جداسازی و تخلیص آنها و بررسی اثر این ترکیبات بر پوسیدگی دندان جالب باشد.

در مورد استفاده از گلاب برای مقابله با پوسیدگی دندان در طب سنتی مطالبی آمده است به گونه‌ای که آن را به عنوان ماده‌ای برای استحکام دندان و تسکین درد ناشی از پوسیدگی معرفی کرده‌اند. (۲۷)، در بررسیهای به عمل آمده تحقیقی در مورد بررسی اثر گلاب بر میکروب‌های دهان یا تشکیل پلاک پیدا نشد و این کار برای اولین بار در مطالعه حاضر درباره اثر آن بر باکتری‌های دهانی گزارش می‌شود. نتایج نشان داد که این ماده معطر اثر زیادی در کاهش اتصال باکتری‌های مورد مطالعه دارد اما روی رشد آنها اثری ندارد و بعد از تشکیل بیوفیلم قادر به حذف آن نمی‌باشد. این یافته می‌تواند متمایز بودن مکانیسم اثر گلاب در کاهش تشکیل بیوفیلم از اثر باکتری کشی و ممانعت از رشد آن را خاطر نشان سازد هر چند نتیجه‌گیری قطعی مستلزم مطالعات بیشتر است.

بر اساس نتایج حاصله از این مطالعه مشخص شد که هر یک از سه ماده مورد مطالعه یعنی سرکه انار، پرسیکا و گلاب به عنوان یک ماده ضد میکروبی با خاصیت ضد اتصالی بر ضد باکتری‌های‌دهانی مفید می‌باشد، درحالی‌که برای حذف بیوفیلم نمی‌توانند مؤثر باشند. این یافته می‌تواند به خاطر چسبندگی شدیدی باشد که در اثر فعالیت استرپتوکوک‌های گروه موتانس به وجود می‌آید. آنها ابتدا با مکانیسم مستقل از سوکروز به اجزای پلیت متصل می‌شوند و در مرحله بعد اتصال وابسته به سوکروز به خاطر سنتز گلوکان غیر محلول در آب به وجود می‌آید. (۲۸)، بنابراین ممکن است این عوامل کلونیزاسیون به حدی شدید عمل کنند که مانع از اثر این عوامل ضد میکروبی در حذف بیوفیلم شوند. پیشنهاد می‌شود با ادامه دقیق تحقیقات مربوط به اثرات سرکه و گلاب در کنترل پوسیدگی دندان، فرآورده‌های مطلوب و با شکل مناسب و بی‌ضرر از این مواد تهیه و پس از طی مراحل، در کارآزمایی بالینی نیز مورد بررسی قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

باتوجه به تأثیر مثبت سرکه انار بر روی رشد استرپتوکوک-های عامل پوسیدگی دندان و همچنین مؤثر بودن سرکه انار و گلاب بر روی کاهش اتصال این باکتری‌ها، توصیه می‌شود کاربرد این مواد در فرمولاسیون‌های دارویی مختلف برای پیشگیری و کنترل پوسیدگی دندان مورد بررسی قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از گروه محترم زیست‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه اصفهان برای حمایت معنوی و معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه اصفهان که حمایت مالی پژوهش را بر عهده داشتند، تشکر و قدردانی می‌شود.

www.SID.ir

Archive of SID

REFERENCES

1. Palombo EA. Traditional medicinal plant extracts and natural products with activity against oral bacteria: Potential application in the prevention and treatment of oral diseases. Evidence-based Complement & Alter Med, 2011; 68354:15.
2. Curzon MEJ, Preston AJ. Risk groups: Nursing bottle caries/caries in the elderly. Caries Res. 2004 Jan; 38(1): 24-33.
3. Lamont RJ, HF. Jenkinson. Oral microbiology at a glance. England: Wiley Blackwell pub; 2010, 85.
4. Taubman MA, Nash DA. The scientific and public-health imperative for a vaccine against dental caries. Nature Rev Immun. 2006 July; 6:555-563.
5. Steinberg D, Feldman M, Ofek I, and Weiss EI. Effect of a high-molecular weight component of cranberry on constituents of dental biofilm. Antimic Chemo. 2004 Jul; 54(1):86-89.
6. Mirz M, Najafpour Navae M. The effect of distillation method on extracted compounds from rose water. Iranian J of M & Aromatic Plants. 2007 Fall; 23(3):375-381.
7.Tabaei-aghdaei SR, Rezaei MB, Jaymand KComparison of experimental and industrial oil rose from a combination of quality and quantity in kashan region. Quart Med and Arom Plants Res in Iran. 2004 Spring;19(1):63-72.
8. Tofighi Z, Molazem M, Doostdar B, Taban P. Antimicrobial activities of three medicinal plants and investigation of flavonoids of *Tripleurospermum disciforme.* Iranian J of Pharm Res. 2015 Jan; 14(1): 225-231.
9. Naquvi KJ, Ansari SH, Ali M and Najmi AK. Volatile oil composition of Rosa damascena Mill. (Rosaceae). J of Pharma&Phytochem. 2014 Dec;2(5) 130-134.
10. Moghaddami F, Soudi M, Rezvanian zadeh M, sepehr Sh. [Isolation of acetic acid bacteria from vinegar and evaluate them thermal stability]. J of Tehran Univ. 2004 Spring, 30(3):549-541. (Persian)
11. Johnston CS and Gaas CA. Vinegar: Medicinal uses and antiglycemic effect. Med Gen Med. 2006 May; 8 (2):61.
12. Setorki M, Asgary S, Eidi A and Khazaei MA. Acute effects of vinegar intake on some biochemical risk factors of atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. Lip in health and disease. 2010 Jan; 9(10):1-8.
13.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 Fall; 6 (3):71-76.
14. Vasconcelos LC, Sampaio FC, Sampaio MCC, Pereira MSV, Higino JS, and Peixoto MHP. Minimum inhibitory concentration of adherence of Punica granatum Linn (pomegranate) gel against *S. mutans, S. mitis and C. albicans*. Brazil Dent J. 2006 Nov; 17(3): 223-227.
15. Salehi P, Kohanteb G, momeni Danaei Sh, vahidi R. Comparison of the antibacterial effect of persica and matrica two herbal mouthwashes with chlorhexidine mouthwash. Shiraz Univ. Dent J. 2005 Jan;6(1,2):63-72.
16. Bayati FA, Sulaiman K. In Vitro Antimicrobial activity of Salvadora persica L. Extracts. against some isolated oral pathogens in Iraq. Turk J Biol. 2008 Feb; 32:57-62.
17. Sadeghi M, Bahramabadi R, Assar S. [Antibacterial Effects of persica and matrica herbal Mouthwashes on common Oral Microorganisms: An In Vitro Study]. J Mash Dent Sch. 2011 Summer; 35(2):107-14. (Persian)
18. Stepanovic S, Vukovic D, Dakic and I Savic B. A modified microtiter plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. Microbiol Methods. 2004 April; 40(2):175-179.
19. Pitts B, Hamilton MA, Zelver N, and Stewart PS. A microtiter-plate screening method for biofilm disinfection and removal. Microbiological Methods. 2003 August; 54 (2):269-276.
20. O Toole GA, and Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens*, Molecular Microbiol. 1998 May; 28(3):446-449.
21. Sonak S, and Bhosle NB. A simple method to assess bacterial attachment to surfaces. Biofouling. 1995 Jan;9 (1):31-38.
22. Tahmourethpour A, Kermanshahi R, salehi R, Nabinezhad A. In vitro effect of probiotic *Lactobacillus fermentom* on adhesine oral streptococci. Iranian J of Med *Microbiol*. 2008 Spring;2(1):45-51.
23. Ismael NF. Vinegar as Anti-bacterial Biofilm formed by Streptococcus pyogenes Isolated from Recurrent Tonsillitis Patients, in vitro. Jordan J of Biol Sci. 2013 Sept;6(3):191-197.
24. Komiyama EY, Back-Brito GN, Balducci I and Koga-Ito CY. Evalution of alternative methods for the disinfection of toothbrushes, Brazilian Oral Res. 2010 Jan-Mar; 24(1):28-33.
25. Loo WT, Jin L, Cheung MN, and Chow LW. Evaluation of Ellagic acid on the activities of oral bacteria with the use of adenosine triphosphate (ATP) bioluminescence assay. Biotech. 2010 Jun; 9(25):3938-3943.
26. Subramaniam P, Dwivedi S, Uma E, Girish Babu KL. Effect of pomegranate and aloe vera extract on streptococcus mutans: An in vitro study. Orig Res. 2012 July;3(3):99-105.
27. Salehi MH, Rosa damascena: Properties and Applications. World J of Nut. 2004 May;3(25). (Persian)
28. Shimazaki Y, Mitoma M, Oho T, Nakano Y, Yamashita Y, Okano. Passive Immunization with Milk Produced from an Immunized Cow Prevents Oral Recolonization by *Streptococcus mutans.* Clin & Diag Lab Immun. 2001 Nov; 8(6):1136-1139.

www.SID.ir