مقاله پژوهشی

بررسی اثر باکتریسیدال و باکتریو استاتیک عصاره هیدروالکلی گیاه نعناع و نمک سدیم کلراید بر روی باکتری استرپتوکوکوس موتانس

محمد رئیسی*، معصومه محمدپور**، دکتر محمدامین فریدونی***، مهدی زارع****، حمید حیدری*****

دریافت: ۹۴/۵/۲۷ پذیرش: ۹۴/۹/۱۴

چکیده:

مقدمه و هدف: پوسیدگی دندان یک بیماری عفونی ناشی از کلونیزاسیون باکتری ها به ویژه استرپتوکوکوس موتانس بوده که با دکلسیفیکاسیون بخش غیر آلی دندان شروع شده و با تخریب ماتریکس آلی دنبال می شود. مطالعات، مقاومت نسبی به عوامل شیمیایی و همچنین آنتی بیوتیک ها در میان میکروفلور طبیعی دهان به خصوص استرپتوکوک های گروه ویریدانس را نشان می دهند. رویکردهای اخیر طب نیز به بهره گیری از گیاهان دارویی، در پیشگیری و درمان بیماری ها به واسطه عوارض جانبی کمتر مورد توجه قرار گرفته است. در این مطالعه میزان اثر باکتریوسایدی و باکتریو استاتیکی عصاره هیدروالکلی گیاه نعناع و نمک بر روی باکتری استرپتوکوکوس موتانس در شرایط آزمایشگاهی مورد مقایسه قرار گرفت.

روش کار: در این مطالعه تجربی از اندام هوایی گیاه نعناع به روش ماسراسیون عصاره هیدروالکلی تهیه شد و پس از تهیه سویه استاندارد باکتری استرپتوکوکوس موتانس و استریل نمودن عصاره توسط فیلتر اثر آنتی باکتریال آن به روش های Agar well diffusion، Agar disk diffusion و Broth micro dilution در محدوده غلظتی ۸۰۰-۰/۷۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر بر باکتری مذکور ارزیابی شد. همچنین محدوده غلظتی ۱۰ – ۰/۵ درصد سدیم کلراید نیز تهیه و اثر آن بر باکتری مورد نظر، سنجیده شد.

نتایج: در روش Agar well diffusion و Agar disk diffusion عصاره هیدروالکلی گیاه نعناع و سدیم کلراید هیچگونه اثر آنتی باکتریال بر باکتری استرپتوکوکوس موتانس مشاهده نشد. در روش broth micro dilution عصاره هیدروالکلی گیاه نعناع نیز هیچگونه اثر آنتی باکتریال بر باکتری استرپتوکوکوس موتانس نداشت در حالی که میزان MIC (Minimum inhibitory concentration) سدیم کلراید ۵ و MBC (Minimum bactericidal concentration) آن ۵/۵ درصد تعیین شد.

نتیجه نهائی: نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره هیدروالکلی گیاه نعناع هیچگونه اثر آنتی باکتریال بر باکتری استرپتوکوکوس موتانس ندارد همچنین بیشترین اثر آنتی باکتریال سدیم کلراید جهت باکتری مذکور از غلظت ۵ تا ۵/۵ درصد می باشد.

کلید واژه ها: استرپتوکوک موتانس / پوسیدگی دندان / سدیم کلراید / گیاه نعناع

مقدمه:

پوسیدگی دندان شایع ترین بیماری مزمن در جهان می باشد. با وجود آنکه امروزه از میزان و شدت آن کاسته شده است ولی هنوز میلیون‌ها کودک و بزرگسال، پوسیدگی و از دست دادن دندان را تجربه می کنند. پوسیدگی دندان یک بیماری عفونی ناشی از کلونیزاسیون باکتری هاست که با دکلسیفیکاسیون بخش غیر آلی دندان شروع شده و با ایجاد پلاک های دندانی باعث تخریب ماتریکس آلی دندان می شود (۱،۲). استرپتوکوک های دهانی جزء مهمی از مجموعهٔ پلاک های دندانی هستند و از مهم ترین اعضای این مجموعه استرپتوکوکوس موتانس است که در مطالعات اپیدمیولوژیک متعددی با پوسیدگی مرتبط دانسته شده است و گمان می رود که نقش اصلی را در آغاز پوسیدگی ایفا می کند (۳). این باکتری ها تا

* کارشناسی ارشد کمیته تحقیقات دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد
** کارشناسی ارشد مرکز تحقیقات هیستومورفومتری و استریولوژی دانشگاه علوم پزشکی شیراز
*** دکتری حرفه ای پزشکی کمیته تحقیقات دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی همدان
**** کارشناسی ارشد کمیته تحقیقات دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی مشهد
***** دانشجوی دوره دکتری Ph.D باکتری شناسی دانشگاه علوم پزشکی شیراز (heidarii.hamid@gmail.com)

۶۰ درصد فلور طبیعی سطوح درون دهان را تشکیل می دهند که می توانند با تولید مواد پلیمری چسبناک و غیر محلول مانند گلوکان و لوان باعث تشکیل بیوفیلم بر سطح مینای دندان شده و با تخمیر مواد قندی مقدار زیادی اسید تولید کنند که اسید حاصله باعث حل شدن مواد معدنی سطح مینای دندان و ایجاد پلاک های دندانی شده و پوسیدگی دندان را موجب می شوند (۴). مکانیسم اولیهٔ اتصال استرپتوکوکوس موتانس ایجاد هوموپلیمرهای گلوکان از سوکروز توسط گلوکوزیل ترانسفراز است (۵،۶) گلوکوزیل ترانسفراز، دو واکنش اصلی را کاتالیز می کند که شامل شکستن سوکروز به گلوکز و فروکتوز (فعالیت سوکرازی) و انتقال واحدهای گلوکز در موقعیت C-3/C-6 برای تولید گلوکان(فعالیت ترانسفرازی) می باشد (۷).

استرپتوکوکوس موتانس از باکتری های گرم مثبت درون دهان بوده که از طریق متابولیزه کردن کربوهیدراتهای مختلف، محیط اسیدی ایجاد می کند. گلوکان خارج سلولی عامل بیماری زایی اصلی این باکتری بوده و عامل ایجاد کننده ی پوسیدگی های دندانی در انسان وحیوانات به شمار می رود. (۸)

بیوسایدهای شیمیایی ترکیبات با ارزشی جهت کنترل مکانیکی پلاک ها برای جلوگیری از پوسیدگی های دندان و بیماری های پریودنتال می باشند (۱۰-۸). مکانیسم اصلی این بیوسایدها تخریب غشای سلولی است که می تواند به سطح دندان ها و مخاط دهان متصل شود و با رهایی عوامل فعال منجر به کاهش میزان سلول های باکتریایی زنده ی دهان شود (۱۳-۱۱). بروز مقاومت نسبی به عوامل بیوساید و همچنین آنتی بیوتیک ها در میان میکروفلور نرمال دهان به خصوص استرپتوکوک های گروه ویریدانس نشان داده شده است (۱۴،۱۵). اگرچه بروز مقاومت ضد میکروبی در میان استرپتوکوک های ویریدانس هنوز مشکلی برای درمان آنتی بیوتیکی عفونتها به عنوان مثال اندوکاردیت ها است، گزارش فزاینده بروز مقاومت نسبت به عوامل ضد میکروبی بتالاکتام، پنی سیلین، اریترومایسین، ماکرولیدها و تتراسایکلین در میان این گروه از باکتری ها، بحرانی جدی در مدیریت درمان را پیش آورده است (۱۴). از آن جایی که بیوفیلمها می توانند ۱۰۰۰ مرتبه پایداری بیشتری نسبت به عوامل ضد میکروبی داشته باشند، میزان حساسیت باکتریهای بیوفیلم نسبت به عوامل ضد میکروبی بسیار کاهش کاهش می یابد (۱۰، ۱۵، ۱۶)، مطالعاتی در مورد کنترل بیوفیلم و تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MICMinimum inhibitory concentration) عوامل ضد میکروبی می تواند مفید باشد (۱۷).

نعناع، گیاهی است علفی و پایا که از رده دولپه‌ای‌های پیوسته گلبرگ که سردسته تیره نعناعیان و از سبزی‌های خوراکی است. ساقه‌های آن دو نوع خزنده و زیر زمینی می‌باشند. از میان ریشه‌ها، یک‌شاخه قائم و برگدار کوچک خارج می‌شود که از تمامی قسمت‌های آن بوی معطر و مطبوعی استشمام می‌شود. ساقه‌این گیاه چهارگوش و به رنگ قرمز مایل به بنفش یا مایل به ارغوانی است (۱۸،۱۹).

گیاه نعناع از جمله گیاهان دارویی است که به واسطه اثرات دارویی متعدد از دیرباز توجه محققان را به خود معطوف داشته است (۱۸). مطابق پژوهش های انجام شده عمده ترین ترکیب نعناع را منتول تشکیل می دهد که یک ترکیب ضد عفونی کننده مهم بوده و دارای اثرات آنتی بیوتیکی بسیار موثری است و نیز باعث ایجاد حس خنکی در پوست و مخاط می گردد (۱۹).

استرپتوکوکوس موتانس جزء باکتری های هالوتلرانت به حساب می آید. هالوتلرانت ها طیف وسیعی از باکتریها را تشکیل می دهند که در برابر نمک مقاوم هستند بدین معنی که در حضور نمک و یا در غیاب آن می توانند تکثیر و رشد کنند. معمولا این باکتری ها در مواد غذایی که ۵ درصد یا بیشتر سدیم کلراید دارند قادر به رشد می باشند و شامل بعضی از انواع باسیلوس میکروکوکوس کورینه باکتریوم، استرپتوکوکوس و کلستریدیم ها هستند (۲۰). شناسایی عوامل و تعیین میزان اثر آنها بر رشد و فعالیت باکتری ها می تواند در زمینه کنترل و بهداشت مواد غذایی به کار گرفته شود زیرا چنانچه یک یا تعدادی از این عوامل در سطح بازدارنده باشند می توانند مانع رشد میکروب ها شوند. گاهی احتمال دارد که ترکیب عوامل بازدارنده به صورت سینرژیکی عمل کنند و اثرات یکدیگر را تشدید نمایند از این رو چنین تصور می شود که با استفاده از چندین عامل بازدارنده به منظور نگهداری مواد غذایی یا احیانا میکروب زدایی محیط های مختلف در مقایسه با کاربرد یک عامل به تنهایی موفقیت آمیز تر باشد (۲۱).

با توجه به بروز مقاومت نسبی به عوامل بیوساید و

همچنین آنتی بیوتیک ها در میان میکروفلور طبیعی دهان به خصوص استرپتوکوک های گروه ویریدانس و رویکردهای اخیر طب به بهره گیری از گیاهان دارویی، در پیشگیری و درمان بیماری ها به واسطه عوارض جانبی کمتر، مقرر گردید که مطالعه ای با هدف بررسی میزان اثر باکتریسیدالی و باکتریو استاتیکی عصاره هیدروالکلی گیاه نعناع و سدیم کلراید بر روی باکتری استرپتوکوکوس موتانس در شرایط آزمایشگاهی انجام گردد.

روش کار:

در این مطالعه تجربی ابتدا از گیاه نعناع عصاره گیری به روش ماسراسیون در مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد انجام شد. عصاره گیری به این نحو بود که ابتدا ۱۰۰ گرم از اندام های هوایی گیاه نعناع در ترکیب با الکل ۸۰٪ در حجم ۱ لیتر به مدت ۷۲ ساعت در ارلن با پوشش آلومینیومی در محیط دور از نور نگهداری شد. مایع حاصله را بعد از دو بار فیلتر کردن با کاغذ صافی (Watman 0.5 USA) در دستگاه (Heidolph WD 2000 Germany) rotary evaporator قرار داده و بعد از تقطیر در انکوباتور C ° ۴۰ قرار گرفت تا در نهایت عصاره با قوام عسلی به دست آمد و به وسیله نرمال سالین یک محلول استوک از آن تهیه شد و در ویال های استریل جهت انجام آزمایشات میکروبی در یخچال نگهداری شد.

در مرحله دوم این مطالعه سوش استاندارد باکتری استرپتوکوکوس موتانس با PTCC 1683 و 35668 ATCC از سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران به صورت لیوفلیزه تهیه شد. به منظور تهیه باکتری از نمونه لیوفلیزه ابتدا نمونه در محیط کشت مایع TSB به صورت Over night (یک شبانه روز در دمای C ° ۳۷-۳۰) کشت داده شد و بعد از ایجاد کدورت در محیط مایع، نمونه بر روی محیط کشت Blood Agar پنج درصد شرکت مرک آلمان کشت داده شد.

جهت بررسی اثر سدیم کلراید بر رشد باکتری استرپتوکوکوس موتانس نیز از غلظت های ۰/۵ تا ۱۰ درصد سدیم کلراید تهیه شده از شرکت مرک آلمان استفاده شد.

سپس به سه روش اثر آنتی باکتریال عصاره هیدروالکلی گیاه نعناع و نمک بر روی باکتری استرپتوکوکوس موتانس بررسی شد.

روش broth micro dilution : این روش طبق پروتکل (Clinical Laboratory Standards Institute) CLSI 2013 انجام شد. ابتدا از عصاره محلول ذخیره (stock) ۶۴۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تهیه و توسط فیلتر استریل شد. سپس رقیق سازی عصاره در پلیت خام الایزا و در دوازده چاهک حاوی محیط کشت TSB به روش Serial dilution (رقیق سازی یک دوم) انجام شد. پس از تهیه سوسپانسیون باکتری مطابق لوله ۰/۵ مک فارلند به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری اضافه شد که نهایتا محدوده غلظتی چاهک ها از µg/ml۸۰۰ تا ۰/۷۸ بود. سپس پلیت حاوی باکتری ها در انکوباتور به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه و در انجام شد. بعد از وقوع رشد MIC و MBC (حداقل غلظت کشندگی) تعیین شد.

در این روش همچنین کنترل هایی با مشخصات زیر مورد استفاده قرار گرفت:

الف: محیط کشت و عصاره، بدون باکتری ← عدم رشد

ب: محیط کشت و نرمال سالین با باکتری ← رشد

ج: محیط کشت و کلرهگزیدین (شاهد مثبت) با باکتری ← عدم رشد

روشهای Agar well diffusion و Agar disk diffusion: این روش طبق پروتکل Douglas & Bakri انجام شد (۲۲). ابتدا از عصاره محلول ذخیره (stock) ۶۴۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تهیه و توسط فیلتر استریل شد. سپس رقیق سازی عصاره در پلیت خام الایزا و در دوازده چاهک حاوی محیط کشت TSB به روش Serial dilution (رقیق سازی یک دوم) انجام شد که نهایتا محدوده غلظتی چاهک ها و دیسک ها از µg/ml ۸۰۰-۰/۷۸ بود. پس از تهیه محیط کشت Blood Agar پنج درصد و توزیع در پلیت ها به ضخامت ۶ میلی متر و تهیه سوسپانسیون باکتری مطابق نیم مک فارلند، سوسپانسیون باکتری با سواپ استریل در سطح پلیت پخش شد. بعد از آن در سطح پلیت ها چاهک هایی به قطر ۶ میلی متر در روش Agar well diffusion و دیسک هایی در روش Agar disk diffusion به فواصل ۳۰ میلی متر قرار داده شد. سپس در هر چاهک و دیسک ۵۰ میکرولیتر از رقت های مختلف عصاره توزیع گردید. سپس در انکوباتور به مدت ۲۴ ساعت در C ° ۳۷انجام شد. بعد از آن وجود یا عدم وجود هاله عدم رشد به دور چاهک بررسی و قطر هاله برحسب میلی متر اندازه گیری شد.

در این دو روش نیز کنترل هایی با مشخصات زیر مورد استفاده قرار گرفت:

الف: چاهک و دیسک آغشته به سرم فیزیولوژی ← قطر هاله عدم رشد صفر میلی متر

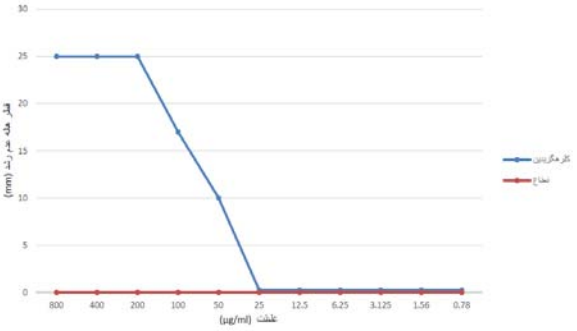
ب: چاهک و دیسک آغشته به کلرهگزیدین ← ایجاد هاله عدم رشد

لازم به ذکر است که آزمایشات مربوط به کشت و همچنین انجام تست های مختلف تشخیصی و حساسیتی باکتری استرپتوکوکوس موتانس نسبت به عصاره هیدروالکلی گیاه نعناع و سدیم کلراید در غلظتهای متفاوت سه بار تکرار شد.

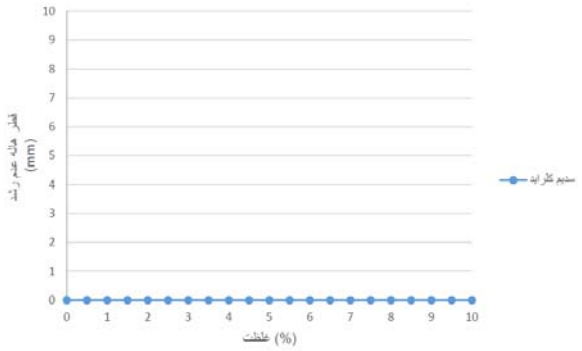
نتایج:

نتایج روش Broth micro dilution: در مورد تاثیر عصاره هیدروالکلی گیاه نعناع با روش Broth micro dilution بر روی باکتری استرپتوکوکوس موتانس نتایج نشان داد که عصاره هیدروالکلی نعناع با طیف غلظت 0.78-800 µg/ml هیچ گونه اثر مهار کنندگی رشد و یا اثر باکتری کشی بر باکتری استرپتوکوکوس موتانس ندارد و بعد از کشت باکتری با غلظت های مختلف عصاره هیدروالکلی گیاه نعناع در محیط Blood Agar پنج درصد شاهد رشد باکتری بودیم. اما در مورد نمک نتایج نشان داد که نمک دارای MIC با غلظت 5 gr/ml و MBC با غلظت 5.5 gr/ml بر باکتری استرپتوکوکوس موتانس اثر دارد.

نتایج روش Agar well diffusion و Agar disk diffusion: در مورد تاثیر عصاره هیدروالکلی گیاه نعناع و نمک با روش Agar well diffusion و Agar disk diffusion بر روی باکتری استرپتوکوکوس موتانس نتایج نشان داد که عصاره هیدروالکلی نعناع و نمک هیچ گونه اثر مهار کنندگی رشد و یا اثر باکتری کشی بر باکتری استرپتوکوکوس موتانس نداشته و بعد از کشت باکتری با غلظتهای مختلف عصاره هیدروالکلی گیاه نعناع و نمک در محیط Blood Agar پنج درصد شاهد رشد باکتری بودیم (شکل ۱و ۲).



شکل ۱: میزان هاله عدم رشد برای استرپتوکوکوس موتانس در غلظت های مختلف عصاره



شکل ۲: میزان هاله عدم رشد برای استرپتوکوکوس موتانس در غلظت های مختلف سدیم کلراید

بحث:

با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه، در روش های Agar well diffusion، Agar disk diffusion و Broth micro dilution عصاره هیدروالکلی نعناع اثر ضدمیکروبی بر باکتری استرپتوکوکوس‌موتانس‌نداشته در حالیکه خاصیت ضد میکروبی نمک تنها در روش Broth micro dilution مشاهده گردید. عوامل تاثیر گذار بر نتایج Agar diffusion بیش از عوامل موثر بر Broth dilution هستند. از جمله مواردی که بر نتایج Agar diffusion موثر است میزان نفوذ ماده ضد میکروبی در آگار است که به ماهیت آن ماده بستگی دارد. ضمنا روش های Agar diffusion برای تعیین حساسیت ضد میکروبی صرفا حساسیت یا مقاومت میکروارگانیسم نسبت به ماده ضد میکروبی را مشخص می کند ولی روش Broth dilution با تعیین MIC و MBC میزان اثر ضد میکروبی را به طور کمی مشخص می کند. بنابراین نتایج روشBroth dilution قابل استنادتر هستند (۲۳،۲۴).

در مطالعه نوری زاده و همکاران با عنوان بررسی آثار ضد باکتریایی عصاره های نعناع، شیرین بیان، پونه، بابونه و آویشن بر هلیکوباکتر پیلوری نتایج نشان داد که عصاره آبی و هیدروالکلی نعناع بیشترین اثر ضد هلیکوباکتر پیلوری را داشت (۲۵).

اما در این مطالعه مشخص شد که عصاره هیدروالکلی نعناع اثر ضد باکتریایی بر روی استرپتوکوکوس موتانس ندارد که می تواند به این دلیل باشد که هلیکوباکترپیلوری باسیل گرم منفی و استرپتوکوکوس موتانس کوکسی گرم مثبت می باشد و چون در دیواره باکتری های گرم مثبت پپتید و گلیکان زیادی موجود می باشد که از اجزای مهم دیواره سلولی باکتری ها بوده و نقش مهمی در استحکام

دیواره سلولی ایفا می کند در حالی که میزان لیپید این باکتری ها کم است. در باکتری های گرم منفی میزان لیپید زیاد و میزان پپتید و گلیکان کم می باشد، که تفاوت نوع دیواره باکتری ها احتمالا باعث تاثیر متفاوت عصاره هیدروالکلی نعناع بر این دو باکتری شده است.

همچنین در مطالعه نجفی و همکاران که خواص ضد میکروبی سه گیاه نعناع، مریم گلی و مرزه را روی باکتری اشرشیاکلی بررسی کردند نتایج حاصله نشان داد که گیاه نعناع دارای بالاترین اثر ضد میکروبی بود (٢۶).

اشرشیا کولی نیز یک باسیل گرم منفی بوده و می توان چنین برداشت نمود که به خاطر نوع دیواره متفاوتی که باکتری اشرشیاکلی با استرپتوکوکوس موتانس دارد باعث تفاوت اثر عصاره نعناع بر این باکتری ها شده است.

با توجه به موارد ذکر شده می توان نتیجه گرفت که تفاوت در دیواره ی باکتری های گرم مثبت و منفی، احتمالا باعث اثر متفاوت عصاره هیدروالکلی گیاه نعناع و بی تاثیر بودن این عصاره بر باکتری های گرم مثبت می باشد.

مطابق این مطالعه نتایج نشان داد که غلظت ۵ درصد نمک خاصیت باکتریواستاتیک و غلظت ۵/۵ درصد نمک خاصیت باکتریسیدالی بر روی باکتری استرپتوکوکوس موتانس دارد.

در مطالعه انجام شده توسط والی و همکاران تاثیر دهان شویه سدیم فلورایـد ۵٪ بـر روی میـزان اسـترپتوکوکوس موتانس و لاکتو باسیل بزاق بررسی شده است. نتایج این تحقیق کاهش میزان این دو باکتری را ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت بعد از مصرف دهان شویه نشان داد (٢٧).

مطالعه حاضر نیز نتایج مشابهی با این مطالعه داشت و نشان داده شد که سدیم کلراید ۵ درصد خاصیت باکتریواستاتیک برروی باکتری دارد و غلظت ۵/۵ درصد آن باعث از بین رفتن باکتری می شود.

همچنین در مطالعه دیگری که توسط علیزاده و همکاران با عنوان تأثیر نمک طعام بر رشد و ویژگی ضد میکروبی لاکتوباسیلوس های جدا شده از خمیر ترش نان های سنتی انجام شد نتایج نشان داد که تا غلظت ۵ درصد نمک، باکتری ها رشد خوبی داشته اند اما از غلظت ۵ تا ۷ درصد رشد باکتری ها به صورت لگاریتمی کاهش می یابد (٢٨).

نتیجه نهایی :

نتایج این مطالعه بیانگر این می باشد که غلظت های بالاتر از ۵ درصد نمک می تواند باعث توقف رشد و حتی باعث از بین رفتن باکتری ها شود. لذا می توان از این خاصیت نمک جهت ضد عفونی کردن و نیز به عنوان عاملی که باعث توقف رشد باکتری ها می شود به مواد غذایی افزود. همچنین با توجه به اینکه در این مطالعه مشخص شد غلظت ۵٪ نمک خاصیت باکتریواستاتیک دارد و غلظت ۵/۵ درصد آن باعث از بین رفتن باکتری استرپتوکوکوس موتانس می شود لذا می توان از این ویژگی در کنار سایر تست ها جهت تشخیص این باکتری استفاده نمود.

سپاسگزاری :

این مقاله برگرفته از طرح تحقیقاتی به شماره۱۰۶۹ در معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد می باشد. بدین وسیله مراتب تقدیر و تشکر خود را از آن معاونت و همچنین کمیته تحقیقات دانشجویی به دلیل حمایت مالی اعلام می داریم.

References

1. Dean JA, Avery DR, Mc Donald RE. Dentistry for the Child and Adolescent. 9th ed. London: Mosby, 2011:177-204.
2. Pinkham JR, Casamassimo PS, Fields HW, Mc Tigue DJ, Nowak AJ. Pediatric Dentistry. 4th ed. London: Mosby, 200:199-203, 225-30.
3. Hamilton IR, Bowden GH. Oral microbiology, Encyclopedia of microbiology. San Diego: Academic Press, 2000: 466-480.
4. Jawets A, Melnick J, Adelberg EA. Review of medical microbiology. A lange medical book. 17th ed. NewYork: Appelton & Lange, 1998: 212-14.
5. Kuramitsu HK. Virulence factors of mutans streptococci: role of molecular genetics. Critical Rev Oral Biol Med 1993;4(2):159-76.
6. Yamashita Y, Bowen W, Burne R, Kuramitsu H. Role of the streptococcus mutans gtf genes in caries induction in the specific-pathogen-free rat model. Infect Immun 1993;61(9):3811-7.
7. Eto A, Saido TC, Fukushima K, Tomioka S, Imai S, Nisizawa T. Inhibitory effect of a self-derived peptide on glucosyltransferase of streptococcus mutans possible novel anticaries measures. J Biol Chem 1999;274(22):15797-802.
8. Biswas S, Biswas I. Role of HtrA in surface protein expression and biofilm formation by Streptococcus mutans. Infect Immun 2005;73(10): 6923-34.

9. Ahiwale S, Tamboli N, Thorat K, Kulkarni R, Ackermann H, Kapadnis B. In vitro management of hospital Pseudomonas aeruginosa biofilm using indigenous T7-like lytic phage. Curr Microbiol 2011;62(2):335-40.
10. Fraud S, Maillard J-Y, Kaminski MA, Hanlon GW. Activity of amine oxide against biofilms of Streptococcus mutans: a potential biocide for oral care formulations. J Antimicrobial Chemotherap 2005;56(4):672-7.
11. Nakano K, Inaba H, Nomura R, Nemoto H, Takeda M, Yoshioka H. Detection of cariogenic Streptococcus mutans in extirpated heart valve and atheromatous plaque specimens. J Clin Microbiol 2006;44(9):3313-7.
12. Baehni P, Takeuchi Y. Anti-plaque agents in the prevention of biofilm-ssociated oral diseases. Oral Dis 2003;9(s1):23-9.
13. Sreenivasan P, Gaffar A. Antiplaque biocides and bacterial resistance: a review. J Clin Periodontol 2002;29(11):965-74.
14. Eley B. Periodontology: Antibacterial agents in the control of supragingival plaque-a review. Br Dent J 1999;186(6):286-96.
15. Papaioannou W, Gizani S, Nassika M, Kontou E, Nakou M. Adhesion of Streptococcus mutans to different types of brackets. Angle Orthodont 2007;77(6):1090-5.
16. Koo H, Schobel B, Scott-Anne K, Watson G, Bowen W, Cury J, et al. Apigenin and tt-farnesol with fluoride effects on S. mutans biofilms and dental caries. J Dent Res 2005; 84(11):1016-20.
17. Wilson M. Susceptibility of oral bacterial biofilms to antimicrobial agents. J Med Microbiol 1996;44(2):79-87.
18. Hey R, Waterman P. Aromatic plants (botany, physiology, chemistry, genetics, biotechnology, international trade). Translater: Bqalyan K. Andarz, 2000 : 21-29. (Persian)
19. Chevallier A.. Encyclopedia of medicinal plants. Ttranslator: Zarezadeh A. Tehran: Vesal, 2003 (Persian).
20. Madigan M, Oren A. Thermophilic and halophilic extremophils. Curr Opin Micro 1999; 2: 265- 269.
21. Thomas LV, Wimpenny JW, Peters AC. An investigation of the effects of four variables on the growth of Salmonella typhimurium using two types of gradient gel plates. Int J Food Microbiol 1991;14(3):261-75.
22. Bakri I, Douglas C. Inhibitory effect of garlic extract on oral bacteria. Arch Oral Biolo 2005; 50(7):645-51.
23. Ncube N, Afolayan A, Okoh A. Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. African J Biotech 2008;7(12).
24. Winn Jr W. Allen S. Janda W. et al. Color Atlas and textbook of diagnostic microbiology. 6th ed. Sydney: Lippincott Williams & Wilkins, 2006: 982 – 988.
25. Nurizadeh E, Mirzapur T, Ghasemi K, Razavi SM, Latifi S. The antibacterial effects of chamomile extracts and thyme oregano, mint and licorice on Helicobacter pylori. Sci J Med Daneshvar Shahed Univ 2004, 11 (52): 67-72. (Persian)
26. Nagafi A, Ghasemzadeh N, Razavi S. Study on antibacterial effects of (Mentha spicata L, Salvia officinalis L and Satureja hortensis L) on Escherichia coli. J Qazvin Univ Med Sci 2008; 33: 15-20. (Persian)
27. Waly NG. Assessment of salivary Lactobacillus and Streptococcus mutans counts following sodium fluoride mouthrinsing in Egyptian children. Egyptian Dent J 1995;41(2):1179-88.
28. Alizadeh SS, Jamalifar H, Samadi N, Eidi A, Fazeli MR. The effect of NaCl on growth and antimicrobial properties of lactobacilli isolated from traditional sourdough bread Central rovince. J Nutr Food Technol 2010; 5(3): 47-56.

Original Article

Evaluation of Mentha Piperita and NaCl effects on Streptococcus mutans

M. Raeisi, M.Sc.[*]; M. Mohammadpour, M.Sc.[**]; M.A. Fereidouni, G.P.[***]
M. Zare, M.Sc.[****]; H. Heidari, Ph.D.[*****]

Received: 18.8.2015 Accepted: 5.12.2015

Abstract

Introduction & Objective: Dental caries is an infectious disease caused by colonization of *Streptococcus mutans* bacteria, which is begun by decalcification of non-organic part of teeth and continued with destruction of organic matrix. According to the incidence of relative resistance of biocide and also antibiotics in the normal micro flora of mouth specially viridians species and recent trends in the use of medicinal herbs to prevent and treat diseases due to fewer side effects, in this study, the MBC and MIC effect of hydro alcoholic extract of Mentha Piperita and NaCl on *S. mutans* in vitro were evaluated.

Materials & Methods: In this experimental study hydro alcoholic extract has been prepared from Mentha Piperita with Maceration method (soaking in a solvent). After the preparation of the *S. mutans* strain standard and sterilization of hydro alcoholic extract by filtering, the antibacterial effects have been evaluated by Agar well diffusion, Agar disk diffusion and broth micro dilution methods (Concentration in the range of 0.78 - 800 micrograms per milliliter (µg/ml)). Meanwhile, the concentration range of sodium chloride 0.5 - 10 % was prepared and its effect on the test bacteria was determined.

Result: In Agar well diffusion method and Agar disk diffusion method the hydro alcoholic extract of Mentha Piperita and NaCl had no antibacterial effect on *S. mutans*. In broth micro dilution method, hydro alcoholic extract of Mentha Piperita had no antibacterial effect on *S. mutans* but the MIC and MBC of NaCl was 5% and 5.5% , respectively.

Conclusion: Our results indicated that the hydro alcoholic extract of Mentha Piperita had not any antibacterial property against *S. mutans* but the most effective antibacterial concentration of NaCl was 5 - 5.5 percent.

(Sci J Hamadan Univ Med Sci 2015; 22 (4):309-315)

Keywords: Dental Caries / Mentaha Piperita / Sodium Cholride / Streptococcus mutans

---

* M.Sc. in Student's Research Committee, Shahrekord University of Medical Sciences & Health Services, Shahrekord, Iran.
** M.Sc. in Histomorphometery and Estieriology Reseach Center, Shiraz University of Medical Sciences & Health Services, Shiraz, Iran.
*** General Practitioner, Student's Research Committee, Hamadan University of Medical Sciences & Health Services, Hamadan, Iran.
**** M.Sc. in Student's Research Committee, Meshed University of Medical Sciences & Health Services, Meshed, Iran.
***** Ph.D. Student in Medical Bacteriology
Shiraz University of Medical Sciences & Health Services, Shiraz, Iran. (heidarii.hamid@gmail.com)