



Växtextrakts effekt på *Streptococcus mutans* biofilmbildning och syraproduktion – en in vitro studie

Författare: Zsuzsanna Kercso

Handledare: Peter Carlsson

Examensarbete (30 hp)
Magisterprogram i Odontologi med inriktning Oral hälsa
Juni 2013

Malmö högskola
Odontologiska fakulteten
205 06 Malmö

1. SAMMANFATTNING

Syfte: Syftet med denna in vitro studie var att testa 8 olika växtextrakt (kanel, nejlika, tranbär, aronia, humle, lime, grönt te, timjan) på två av *Streptococcus mutans* egenskaper, biofilmbildning och syraproduktion, samt mäta totala fenolmängden i varje växtextrakt.

Material och metod: Vattenbaserat (humle, aronia, tranbär, grönt te) och etanolbaserat (nejlika, kanel, timjan, lime) växtextrakt testades på *S. mutans* biofilmbildning och syraproduktion. Biofilmen framställdes i mikrotiterplattor. Bacto™ Todd Hewitt Broth näringslösning och en nyligen isolerad stam av *S. mutans* användes. Den totala fenolmängden i varje växtextrakt mättes kolorimetriskt.

Resultat: Kanel, nejlika och tranbär utövade inhibition på *S. mutans* biofilmbildning men humle, grönt te, timjan och lime inte påvisade någon inhibitionseffekt. Från studieresultatet framgår också att de testade växtextrakten förutom timjan hade inhibitionseffekt på *S. mutans* syraproduktion. Aronia som tidigare inte testats på kariogena bakterier uppvisade i likhet med tranbär inhibitionseffekt på *S. mutans* biofilmbildning och syraproduktion. Extraktens lägsta koncentration med inhibitionseffekt (MIC) på biofilmbildning och syraproduktion varierade mycket liksom växtextraktens totala fenolmängd och inget tydligt samband kunde påvisas mellan inhibitionseffekter och den totala fenolmängden.

Slutsats: Vissa av de testade växtextrakten har inhibitionseffekt på *S. mutans* biofilmbildning och syraproduktion. Växtextraktens inhibitionseffekter på *S. mutans* biofilmbildning och syraproduktion är oberoende av varandra. Växtextraktens inhibitionseffekter på *S. mutans* biofilmbildning och syraproduktion är inte relaterade till den totalafenolmängden.

2. ABSTRACT

Aim: The aim of this in vitro study was to test eight different plant extracts (cinnamon, clove, cranberry, chokeberry, hops, lime, green tea, thyme) for inhibition of *Streptococcus mutans* properties biofilm formation and acid production, as well as measuring total phenolic content in each plant extract.

Material and methods: Water-based (hops, chokeberry, cranberry, green tea) and ethanol-based (clove, cinnamon, thyme, lime) plant extract was tested on *S. mutans* biofilm formation and acid production. The biofilm was prepared in microtiter plates. Bacto Todd Hewitt Broth™ broth and a freshly isolated strain of *S. mutans* were used. The total phenolic content in each plant extract was measured colorimetrically.

Results: Cinnamon, clove and cranberry exerted inhibition on *S. mutans* biofilm formation, but hops, green tea, thyme and lime did not demonstrate inhibition effect. All tested plant extracts except for thyme had inhibitory effect on *S. mutans* acid production. Aronia, not previously tested on cariogenic bacteria showed, like the cranberry inhibition effect on *S. mutans* biofilm formation and acid production. Extracts lowest concentration with inhibition effect (MIC) on biofilm formation and acid production varied widely as well as plant extracts total phenol amount and no clear correlation between inhibition effects and total phenolic content was seen.

Conclusion: Some of the tested plant extracts had inhibitory effect on *S. mutans* biofilm formation and acid production. Plant extracts inhibitory effects on *S. mutans* biofilm formation and acid production was independent of each other. Plant extracts inhibitory effects on *S. mutans* biofilm formation and acid production was not related to total phenol content.

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

1. SAMMANFATTNING.....	1
2. ABSTRACT	1
3. INLEDNING	4
4. MATERIAL OCH METOD	5
4.1 Framställning av växtextrakt	5
4.2 Framställning av kulturmedium (TH buljong med 1 % sackaros)	6
4.3 Framställning av startkultur	6
4.4 Bestämmelse av bakterieantal (OD mätning)	6
4.5 Biofilmframställning i mikrotiterplatta	6
4.6 Bestämning av pH värde	7
4.7 Biofilminhibition	7
4.8 Mätning av växtextraktens totala fenolmängd	8
4.9 Statistisk analys	8
5. RESULTAT	9
6. DISKUSSION	14
7. SLUTSATS	17
8. REFERENSER	17

3. INLEDNING

Växter användes och används för att förebygga, lindra och bota sjukdomar (1). De positiva effekterna på allmänhälsa är väldokumenterade i gamla folkmedicinska texter och i nutidens vetenskapliga artiklar. Växter har använts till exempel för att förebygga hjärt-, kärlsjukdomar (2,3), cancer (2,4,5), bekämpa svamp- och andra infektionssjukdomar (6,7), stimulera aptiten och matspjälkningen (5), sänka blodtryck och kolesterol (3) och som sömnmedel (5,7). I allmänhet är det inte lika känt om växter har positiva effekter även på oral hälsa (8). Det finns många studier som belyser att vissa substanser i växter har hämmande effekt på mutansstreptokocker (9-11).

Mutansstreptokocker är en bakteriegrupp som är förknippad med karies. De mest kända arterna som tillhör gruppen är *Streptococcus mutans* och *Streptococcus sobrinus*. Mutansstreptokocker har olika egenskaper som har stor betydelse för kariesuppkomst. De är syrabildare (acidogena), syratåliga (aciduriska), kan fästa på tandyta (adherera) och har stor förmåga att bilda plack (biofilm). Mutansstreptokocker har en rad olika enzym som deltar i sockermetabolismen. Med hjälp av dem *dess* bryts socker ner till mjölksyra som kan demineralisera tandsubstans. Samtidigt bildar bakterierna extracellulära polysackarider som ger ett kletigt och tjockt plack. Bakterierna kan även lagra kolhydrater i form av intracellulära polysackarider. Bakterierna använder dem som reserv vid minskad sockertillgång (10-14). Att kunna hämma någon eller flera av dessa egenskaper hos mutansstreptokocker skulle kunna vara av betydelse för kariesprevention. Det vanligaste sättet att påverka mutansstreptokocker är att hämma bakterietillväxt med olika antiseptiska medel (15,16). Men genom att påverka *S. mutans* förmåga att bilda biofilm eller genom att minska deras syrabildningsförmåga skulle sannolikt kariesrisken minskas.

Vissa växtsubstanser som utövar hämning på mutansstreptokockers egenskaper tillhör olika polyfenoler/fenolföreningar (10). Polyfenoler består av en eller flera aromatiska bensenringar/fenoler med en eller flera hydroxylgrupper (17,18). Naturliga polyfenoler är sekundära metaboliter (nedbrytningsprodukter) i växter. Dessa metaboliter är inte delaktiga i växternas normala tillväxt, utveckling och reproduktion, utan de fungerar som skyddsmekanism mot olika angreppsfaktorer som t.ex. solstrålning, insektsangrepp eller växtätande djur (10,19).

Enligt vissa studier kan man med växtextrakt eller substanser isolerade från växtextrakt resultera i minskad aktivitet hos mutansstreptokocker i munhålan. Grönt te och svart te (*Camellia sinensis*) hämmar *S. mutans* och *S. sobrinus* syraproduktion, adhesion och glykosyltransferas (11,20,21). Extrakt från grönt- och rostat kaffe (*Coffea arabica*, *Coffea canephora*) motverkar *S. mutans* bakterietillväxt (22). Timjan (*Thymus vulgaris*) och kanel (*Cinnamomum sp.*) har hämmande effekt på plackbildningen (23,24). Rött vin hämmar *S. mutans* biofilmbildning och adhesion till tandyta (25). Rosmarin (*Rosmarinus officinalis*) dämpar plackbildning och glykosyltransferasaktiviteten hos *S. sobrinus* (12). Tranbär (*Vaccinium oxycoccus*) minskar *S. mutans* och *S. sobrinus* syraproduktion, adhesion, biofilmbildning samt produktion av glykosyl- och fruktosyltransferaser (4,26,27). Kakao (*Theobroma cacao*) reducerar *S. mutans* och *S. sanguis* plackbildningsförmåga och syraproduktion (28). Humle (*Humulus lupulus*) har plackreducerande effekter och hämmar *S. mutans*, *S. sanguis* adhesion och glykosyltransferasaktivitet (29-31). Studierna är gjorda både

in vitro och in vivo. De belyser växtextraktens hämmande effekt på mutansstreptokocker, men det finns också studier som visar motsägande resultat (32,33). De bakomliggande verkningsmekanismer för dessa effekter och resultat är oklara.

Till den här studien har 8 olika växter valts ut: grönt te (*Camellia sinensis*), humle (*Humulus lupulus*), kanel (*Cinnamomum sp.*), kryddnejlika (*Eugenia aromaticum*), lime (*Citrus aurantiifolia*), svart aronia (*Aronia melanocarpa*), timjan (*Thymus vulgaris*), tranbär (*Vaccinium oxycoccus*). Sju av dem är välkända, med dokumenterad effekt på mutansstreptokocker. Svart aroniabär är mindre studerat och har enligt litteraturen inte varit testad på mutansstreptokocker. Tidigare forskning har visat att aronia kan ha förebyggande effekt på hjärt-, kärlsjukdomar och cancer. Bären har också använts som antiseptiskt medel, mot urinvägsinfektion, att främja matsmältningen och att sänka kolesterolhalt och blodtryck (3,4,34).

Syftet med studien är att testa effekten av växtextrakt, på två av *Streptococcus mutans* egenskaper: biofilmbildning (I) och syraproduktion (II) samt mäta den totala fenolmängden (III) i varje växtextrakt. Sättet att samtidigt testa biofilmbildningen och syraproduktionen är nytt och är viktigt därför att de två egenskaperna av *S. mutans* kan studeras tillsammans under samma förutsättningar.

4. MATERIAL OCH METOD

4.1 Framställning av växtextrakt

Växterna/preparaten som användes i studien införskaffades från följande ställen:

Aronia: Sveriges lantbruksuniversitet, Växtförädling och bioteknik i Balsgård.

Humle: Humlegårdens ekologers webbutik, humle Columbus med 16,0% alfasyra,

Grönt te: House of Tea webbutik, ekologiskt odlat grönt te (Song Zhen) från Kina.

Lime, ekologiskt färsk timjan, mald nejlika och mald kanel: Coop Forum.

Osötad tranbärdricka: Life hälsokostaffär.

Växterna/preparaten delades in i två grupper. Växter som aronia, humle, grönt te, och tranbär bedömdes innehålla mer vattenlösliga ämnen och de extraherades med avjoniserat analysvatten. Nejlika, kanel, timjan och lime bedömdes innehålla mer fettlösliga ämnen och de extraherades med 70 % -tig etanol.

Vatten och etanol tillsattes enligt Tabell 1, stod över natten på 37°C i ca.16 timmar.

Växtextrakten förutom humle filterades genom filterpapper (Nr.3 Munktell Filter AB, Sweden). Nejlika -, kanel -, timjan - och limetinkturen späddes ut med analysvatten för att uppnå ett etanolkoncentrat på 20 % i extrakten. Denna koncentration brukar förekomma i munvatten t.ex. Listerin (16). Humleblandningen centrifugerades vid 3000 varv/min i 10 minuter i Universal 320R centrifug (Hettich, England). Vätskan hälldes av och sterilfilterades (Sterilfilter Nalge 0,45 µm, Sigma Nalge Nunc International, USA). Växtextrakten förvarades i kylskåp. Dagen innan experimentet centrifugerades tranbärkoncentratet och kanelextrakten vid 3000 varv/min i 10 minuter i Universal 320R (Hettich, England) för att få bort grumlighet.

Tabell 1. Växternas del, vikt (g) och tillsatt vatten respektive 70 % - tig etanol mängd (ml).

Växter	Del av växt	Växtvikt (g)	Vatten mängd (ml)	Etanol 70 % (ml)
Aronia	Frystorkade och pulveriserade bär	5	50	
Humle	Torkade kottar	2,5	50	
Grönt te	Torkat teblad	10	100	
Tranbär	Juice		Koncentrat 1:4	
Nejlika	Torkade, pulveriserade blomknoppar	1		10
Kanel	Pulveriserad kanelbark	1		10
Timjan	Färska kvistar	4		20
Lime	Färskt fruktkött med skal	20		20

4.2 Framställning av kulturmedium

Bacto™ Todd Hewitt Broth pulver (Becton, Dickinson and Company, USA), sackaros och analysvatten användes. 15g TH pulver och 5g sackaros löstes upp i 500 ml analysvatten i en glasflaska. Blandningen autoklaverades i 121°C i 20 minuter. Efter avsvälning förvarades den i kylskåp.

4.3 Framställning av startkultur

En nyligen isolerad vild bakteriestam - *Streptococcus mutans* KK24 F1 - och TH buljong användes. Dagen innan experimentet sattes 200µl bakterieodling (djupfrost i skummjolk i -20°C) i 10 ml TH buljong. Blandningen odlades aerobt i värmeskåp vid 37°C under 24 timmar.

4.4 Bestämning av bakterieantal

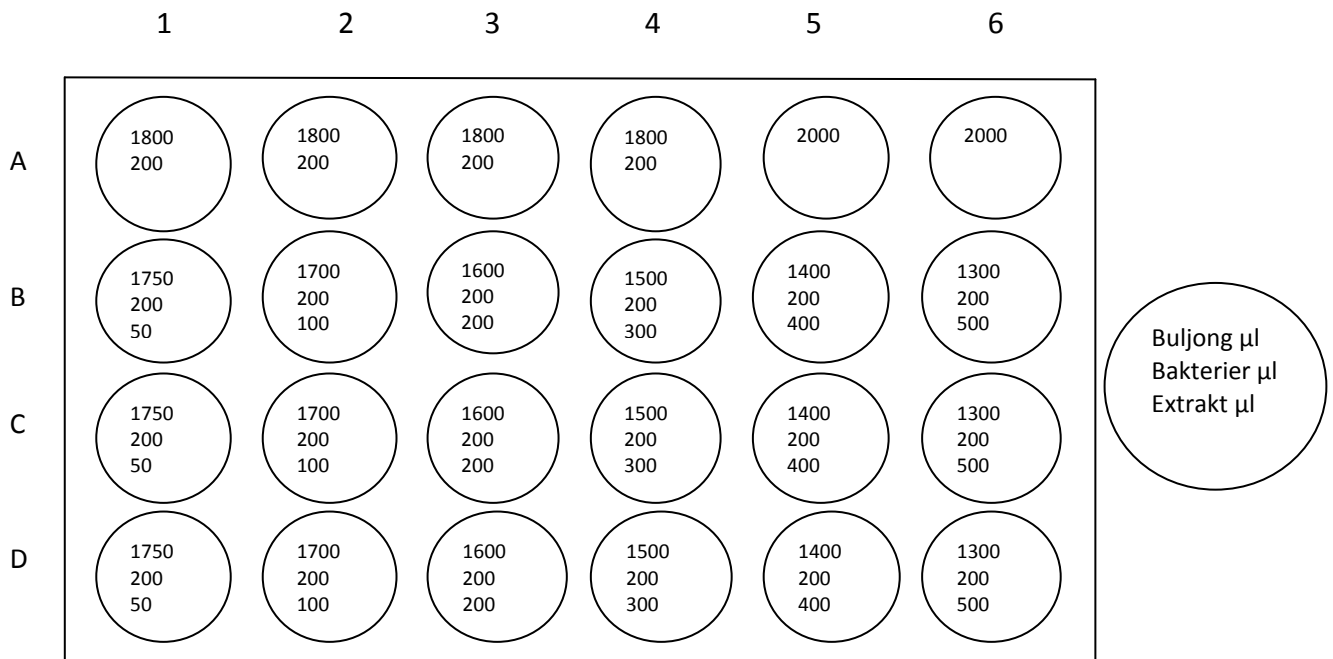
Startkulturen späddes ut med TH buljong till en optisk densitet (OD) på 0,2. OD mättes med spektrofotometer U - 1900 Spektrofotometer (Hitachi, Japan) vid 650 nm. Mixer, Mono mixer (Sarstedt AG & co, Germany) användes för att suspendera startkulturen.

4.5 Biofilmframställning i mikrotiterplatta

Åtta, 24 brunnars Multidish mikrotiterplattor (Nalge Nunc International, USA) användes till 8 växtextrakt - svart aronia, humle, grönt te, tranbär, nejlika, kanel, timjan och lime - i triplikat enligt Figur 1.

Varje brunn innehöll 2000 µl. Brunnarna A1 – A4 innehöll 1800µl buljong och 200µl bakterier med OD på 0,2. Mono mixer (Sarstedt AG & co, Germany) i kombination med en magnetstav användes för att bibehålla en homogen suspension i startkulturen. Brunnarna A5, A6 innehöll 2000µl TH buljong (blank). Brunnarna i rad B, C och D innehöll 200µl bakterier och buljong + växtextrakt blandning i följande proportioner (µl): 1750 + 50, 1700 + 100, 1600 + 200, 1500 + 300, 1400 + 400 och 1300 + 500. Brunnarnas alkoholhalt vid användning av etanolbaserat växtextrakt av nejlika, kanel, timjan och lime i rad B, C, D

beräknades till 0,5 % vid 50 μ l, 1 % vid 100 μ l, 2 % vid 200 μ l, 3 % vid 300 μ l, 4 % vid 400 μ l, och 5 % vid 500 μ l. Plattorna inkuberades i 5 % koldioxid, 95 % kväve i 37 $^{\circ}$ C i 3 dagar.



Figur 1. Mikrotiterplatta (brunnarnas innehåll och volym i μ l).

4.6 Bestämning av pH värde

Efter 3 dagars odling, mättes pH med glaselektrod i varje brunn (632 pH Meter, Metrohm AG, Switzerland).

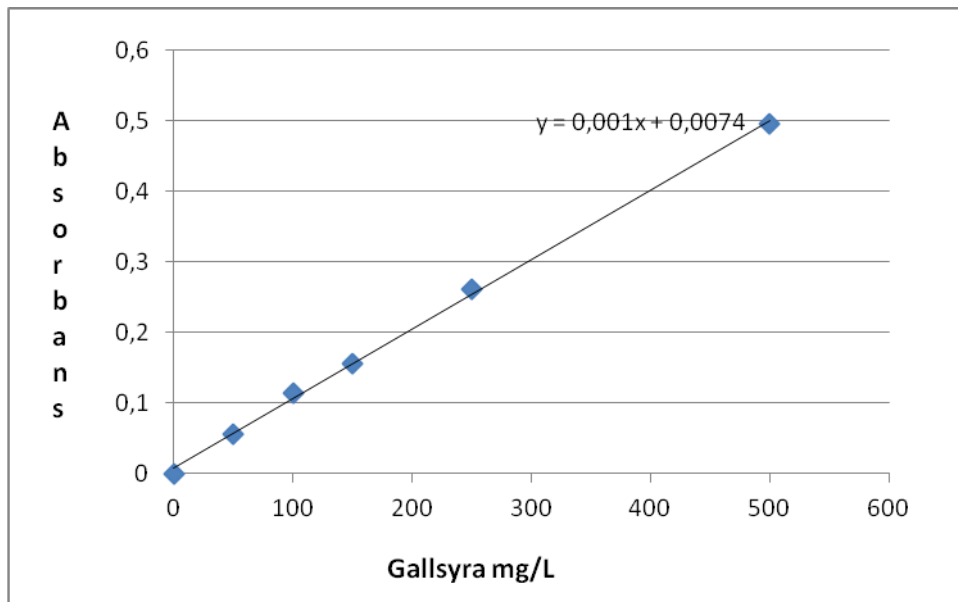
4.7 Biofilminhibition

Blandningarna från mikrotiterplattornas brunnar hälldes av. Brunnarna tvättades 3 gånger med 2000 μ l fosfatbuffrat fysiologisk koksaltlösning (PBS) med 7,2 pH. Vid varje tvättning skakades plattorna i skakanordning Grant-bio PMS-1000 (Keison Products, England) i 30 sekunder för att få bort icke vidhäftande bakterier. Biofilmen fixerades med 2000 μ l etanol (70 %) under 15 minuter. Etanolen hälldes av och plattorna torkades i värmeskåp. Biofilmen i varje brunn färgades in med 200 μ l 0,05 % -ig kristallviolett och 1800 μ l PBS under 15 minuter. Plattorna sköljdes med analysvatten 4 ggr och torkades. Färgen från biofilmen löstes upp med 2000 μ l ättiksyra (100 %) under 1 timme. Absorbansen avlästes med plattläsare, spektrofotometer ELx800 (Bio-Tek[®] Instruments, USA) vid 595nm och mjukvaran KC Junior (Bio-Tek[®]) för PC.

4.8 Mätning av växtextraktens totala fenolmängd

I varje växtextrakt mättes den totala fenolmängden enligt Slinkard, K. och Singleton, V. L beskrivning (35). Analysvatten, växtextrakt, Folin Ciocalteureagens (Merck & co., INC., USA), gallsyra (Merck & co., INC., USA) och natriumkarbonatlösning användes.

Åtta separata kyvetter fylldes med 1,58 ml analysvatten, 100 µl Folin-Ciocalteu reagens och 20 µl växtextrakt. Mono mixer (Sarstedt AG & co, Germany) användes för att blanda kyvetternas innehåll. Efter blandningen tillsattes 300 µl natriumkarbonatlösning och blandades igen. Kyvetterna sattes i värmeskåp på 37°C i 30 minuter. Absorbansen för varje lösning mättes med U - 1900 Spektrofotometer (Hitachi, Japan) vid 765 nm. Absorbansen jämfördes med kalibreringskurva (Figur 1) baserat på gallsyralösning i sex olika koncentrationer: 0, 50, 100, 150, 250 och 500 mg/L. När totalfenolhalten i vissa växtextrakt (kanel, nejlika, te) överskred kalibreringskurvans kapacitet spädades växtextrakten till en tiondel för att fenolmängden skulle ligga innanför kalibreringskurvans mätområde. Resultatet uttrycks i gallsyra ekvivalent mg/L.



Figur 2. Kalibreringskurva (absorbans kontra koncentration)

4.9 Statistisk analys

Studieresultaten bearbetades med ensidig variansanalys ANOVA för att få fram eventuella skillnader mellan de olika testgrupperna i varje växtextrakt. Post Hoc Test med Scheffe´s metod användes för att fastställa växtextraktens lägsta koncentration med inhibitionseffekt (MIC) på *S. mutans* biofilm och syraproduktion. Testerna utfördes vid signifikansnivå på $p < 0,05$. De statistiska testerna utfördes med hjälp av IBM SPSS Statistic 20 dataprogram.

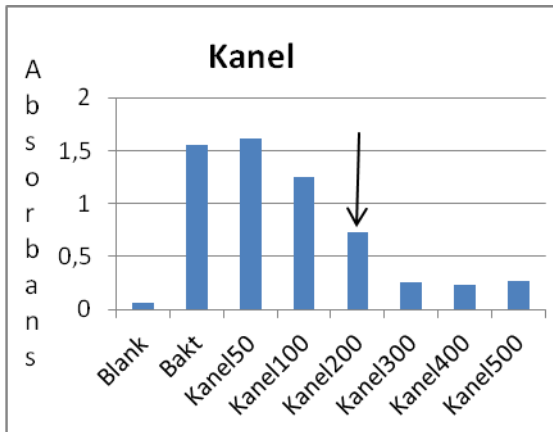
5. RESULTAT

I denna studie testades 8 olika växter (kanel, nejlika, tranbär, aronia, humle, te, lime och timjan) på två av *S. mutans* egenskaper: biofilmbildning och syraproduktion, samt totala fenolmängden mättes i varje växtextrakt. Sammanställning av växtextraktens lägsta koncentration med inhibitionseffekt (MIC) och totala fenolmängd visas i Tabell 2.

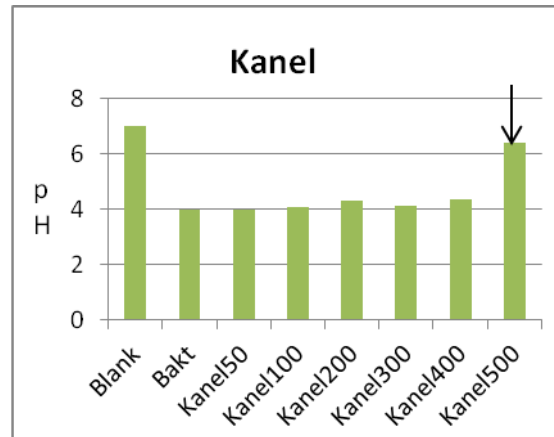
Tabell 2. Växtextraktens MIC avseende biofilmbildning, syraproduktion (pH) samt totala fenolmängd (ANOVA, Post Hoc Test, Scheffe $p < 0,05$).

Växter	MIC på biofilmbildning (μl växtextrakt)	MIC på syraproduktion (pH) (μl växtextrakt)	Totala fenolmängd i gallsyra ekvivalent (GAE mg/L)
Kanel	200	500	1796
Nejlika	200	200	2058
Tranbär	200	200	302
Aronia	200	300	288
Humle	ej inhib.	100	197
Te	ej inhib.	300	1569
Lime	ej inhib.	400	262
Timjan	ej inhib.	ej inhib.	119

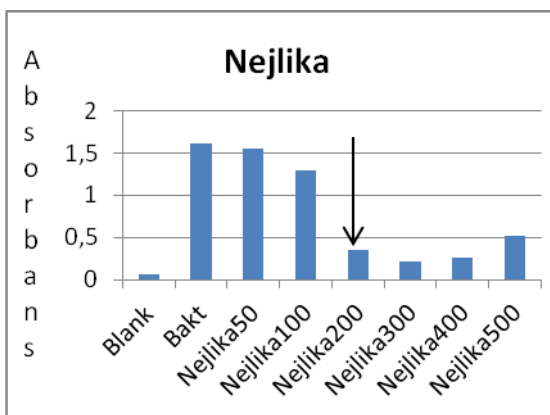
Figur 2a till figur 9b visar växtextraktens påverkan på *S. mutans* biofilmbildning och syraproduktion vid olika växtextraktkoncentrationer. Staplar anger medelvärde av experimentresultaten som utfördes i triplikat. ”Blank” är TH buljong dvs. prov utan tillsatt reagens. ”Bakt” är *S. mutans* i buljong, de övriga staplarna visar bakterier i buljong med 50 μl -500 μl reagens/växtextrakt (fig.1). Pilen visar växtextraktens lägsta koncentration med inhiberande effekt.



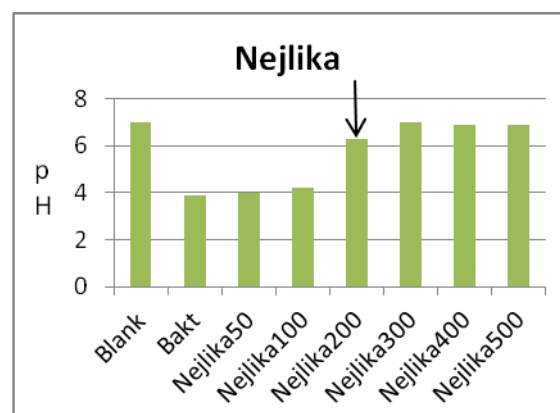
Figur 2a. Kanelns MIC på *S.mutans* biofilm.



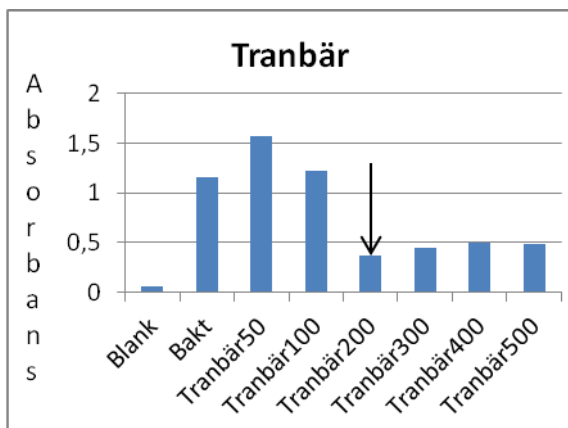
Figur 2b. Kanelns MIC på *S.mutans* syraproduktion.



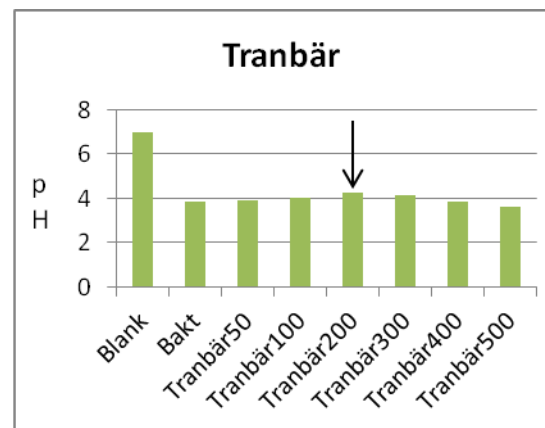
Figur 3a. Nejlikas MIC på *S.mutans* biofilm.



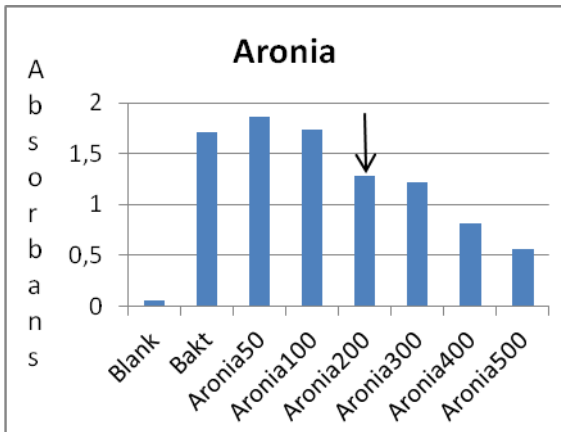
Figur 3b. Nejlikas MIC på *S.mutans* syraproduktion.



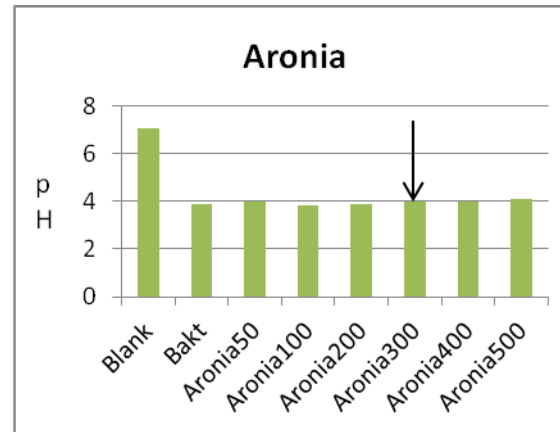
Figur 4a. Tranbärs MIC på *S.mutans* biofilm.



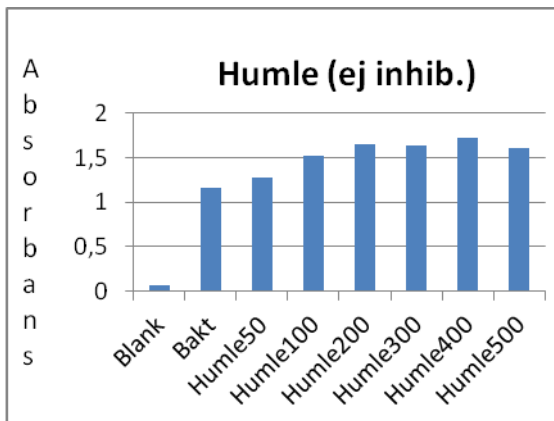
Figur 4b. Tranbärs MIC på *S.mutans* syraproduktion.



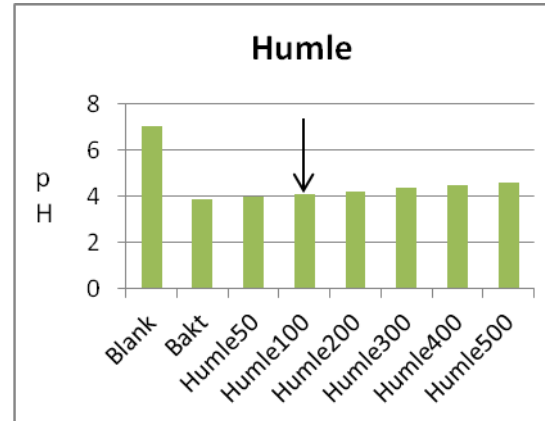
Figur 5a. Aronias MIC på *S. mutans* biofilm.



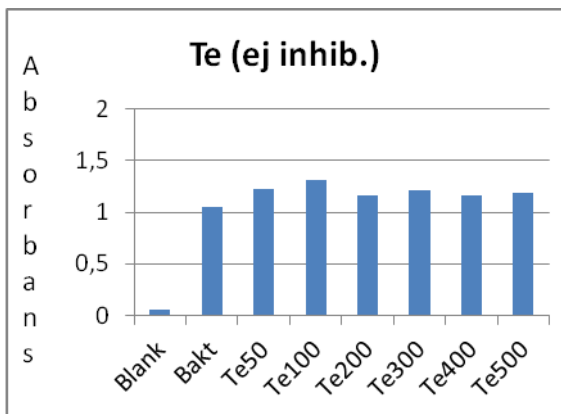
Figur 5b. Aronias MIC på *S. mutans* syraproduktion.



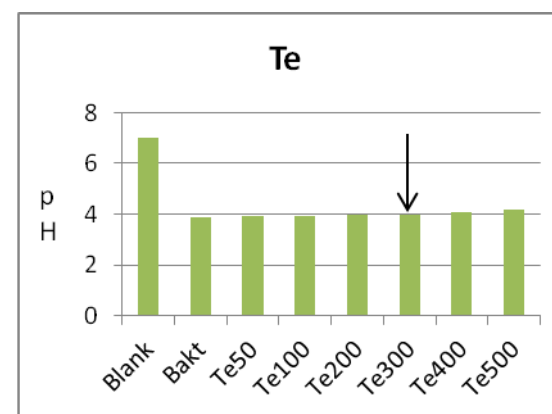
Figur 6a. Humle gav tillväxt på *S. mutans*, ej biofilminhibition.



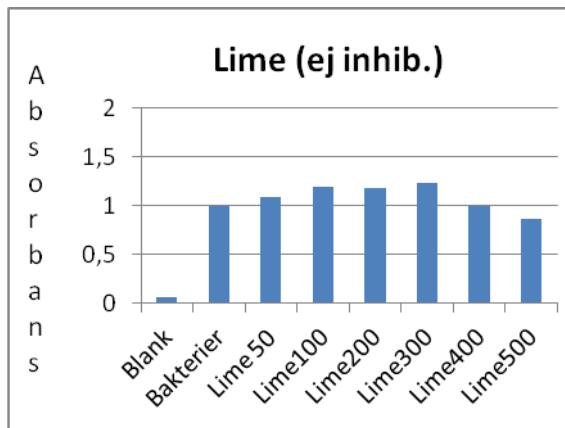
Figur 6b. Humles MIC på *S. mutans* syraproduktion.



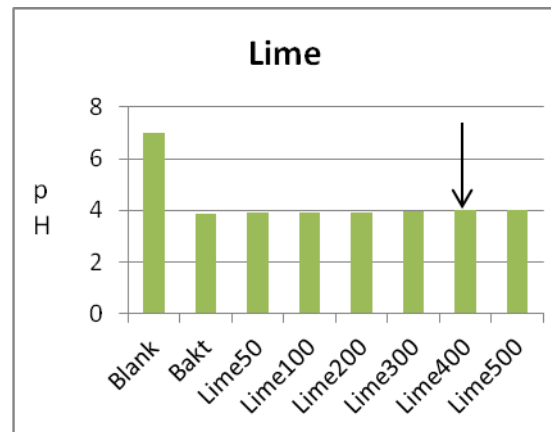
Figur 7a. Te gav tillväxt på *S. mutans*, ej biofilminhibition.



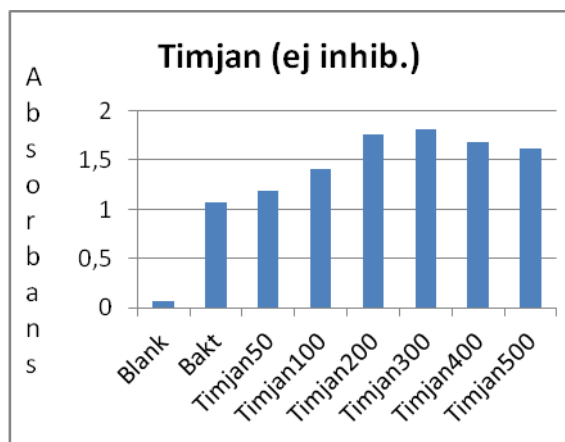
Figur 7b. Tes MIC på *S. mutans* syraproduktion.



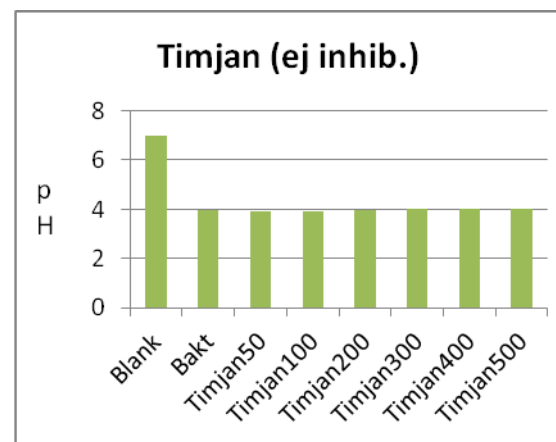
Figur 8a. Lime gav tillväxt på *S.mutans*, ej biofilminhibition.



Figur 8b. Limes MIC på *S.mutans* syraproduktion.

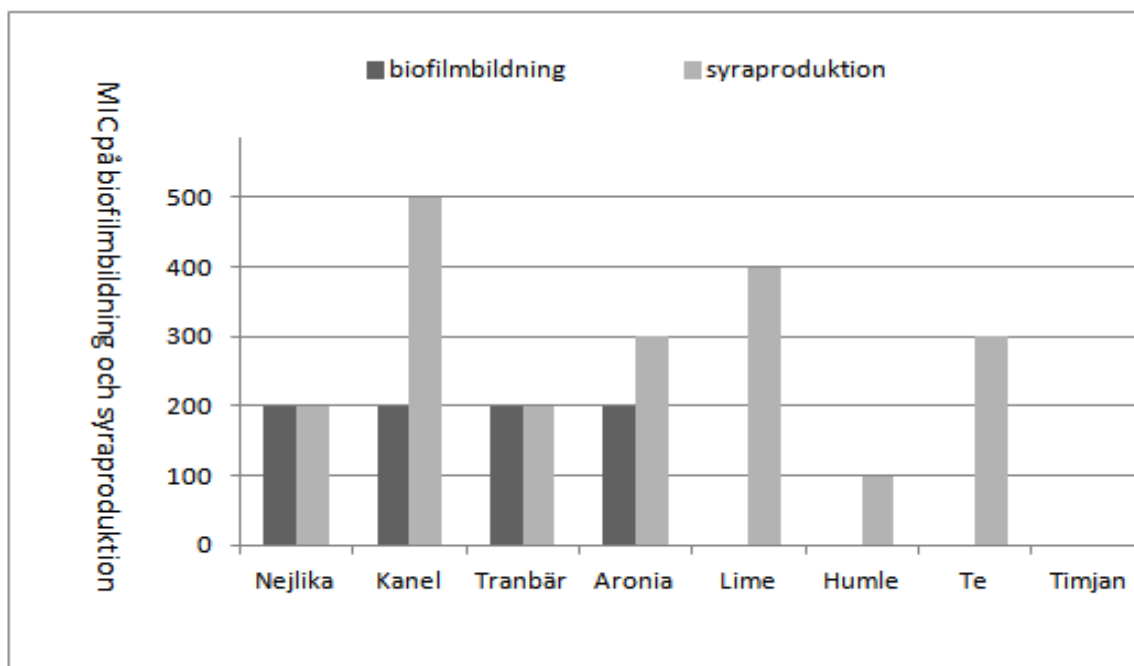


Figur 9a. Timjan gav tillväxt på *S.mutans*, ej biofilminhibition.



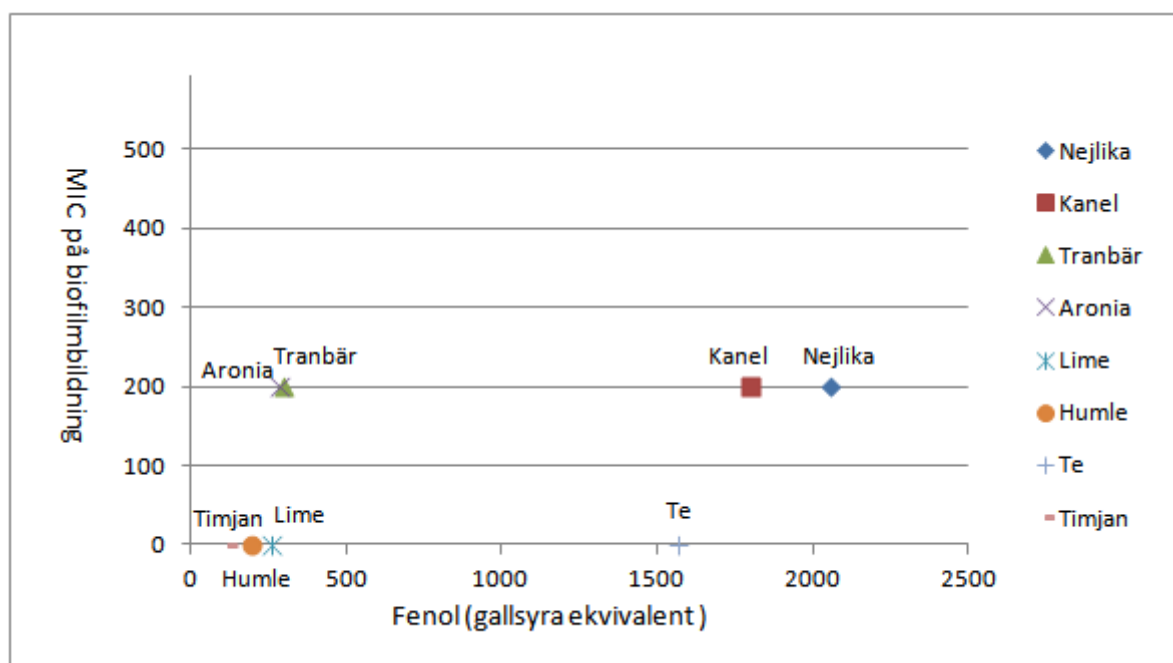
Figur 9b. Ej inhibition på *S.mutans* syraproduktion.

Figur 10 visar sammanställning av växtextraktens MIC (μl) på *S. mutans* biofilmbildning och syraproduktion. Resultatet visar att kanel, nejlika, tranbär och aronia utövar inhibition på *S. mutans* biofilmbildning vid tillsättning av 200 μl växtextrakt. Nejlika, kanel, tranbär, aronia, lime, humle och te har inhibitionseffekt på *S. mutans* syraproduktion. Växternas MIC på syraproduktions inhibition varierar från 100 μl - 500 μl växtextrakt.

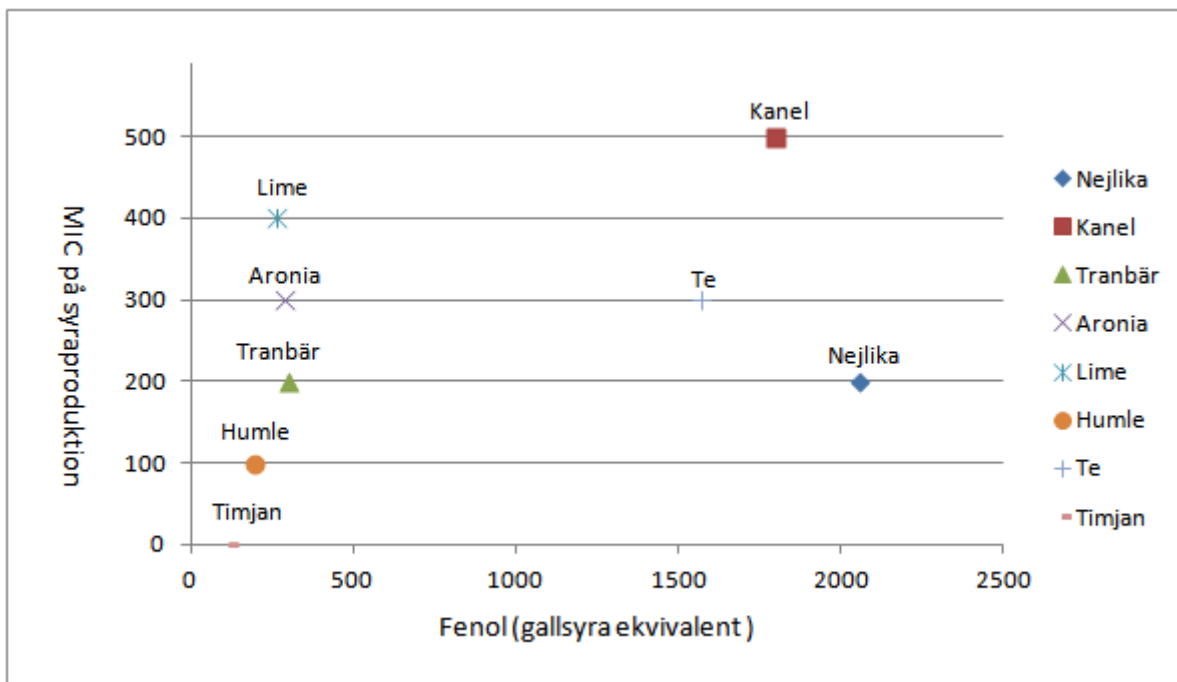


Figur 10. Växtextraktens MIC (µl) på *S. mutans* biofilmbildning och syraproduktion. Lime, humle, te utan inhibitionseffekt på biofilmbildning. Timjan utan inhibitionseffekt på biofilmbildning och syraproduktion.

Växtextraktens MIC på *S. mutans* biofilmbildning och syraproduktion i relation till växtextraktens fenolmängd visas i figur 11 och figur 12. Inget samband kan påvisas mellan totalfenolmängd och växtextraktens MIC avseende biofilminhibition eller syraproduktionsinhibition.



Figur 11. Växternas MIC (µl) på *S. mutans* biofilmbildning i relation till växternas fenolmängd (gallsyra ekvivalent mg/L)



Figur 12. Växternas MIC (µl) på *S. mutans* syraproduktion i relation till växternas fenolmängd (gallsyra ekvivalent mg/L).

6. DISKUSSION

Ett antal olika faktorer samverkar vid uppkomsten av karies (14). Att kunna hämma vissa av dessa faktorer som t. ex. biofilmbildning och syraproduktion av *S. mutans* och andra syraproducerande bakterier skulle sannolikt innebära att kariesprocessen hämmas. Mindre plack skulle betyda färre kariogena bakterier och med minskad syrabildning skulle plackens buffringskapacitet kunna höjas.

Syftet med denna studie var att testa åtta olika växtextrakt på två av *S. mutans* egenskaper, biofilmbildning och syraproduktion, samt mäta den totala fenolmängden i varje växtextrakt. Sättet att kombinera och tillsammans testa biofilmbildningen och syraproduktionen är nytt i denna studie och det är viktigt eftersom en hämning av dessa egenskaper skulle kunna öka resistensen mot karies trots eventuell bristande munhygien.

Studieresultatet visar att kanel, nejlika och tranbär utövar inhibition på *S. mutans* biofilmbildning medan humle, grönt te, timjan och lime inte påvisar någon inhibitionseffekt. Från studieresultatet framgår också att de testade växtextrakten förutom timjan har inhibitionseffekt på *S. mutans* syraproduktion. Aronia som tidigare inte testats på kariogena bakterier uppvisar i likhet med tranbär inhibitionseffekt på *S. mutans* biofilmbildning och syraproduktion.

Det finns många andra in vivo och in vitro studier som rapporterar att växter/växtsubstanser har varierande effekt på mutansstreptokockers egenskaper, med störst framgång på bakterietillväxt. Därför tas dessa studier upp i diskussionen trots att bakterietillväxt inte undersöktes i denna studie.

En in vitro studie av Filoche et. al. visar att kanel har hämmande effekt på *S. mutans* bakterietillväxt (23). En annan studie på agarplattor rapporterar att både kanel och nejlika har antibakteriell effekt på *S. mutans* (6). Ett motsägelsefullt resultat presenterades av Cai et. al. där åtta olika nejlikekomponenter testades i näringslösning (33). Resultatet visar ingen antibakteriell aktivitet på *S. mutans*.

Resultaten i denna studie avseende tranbär stöds av resultat i tidigare in vitro och in vivo studier. I en in vitro studie av Yamanaka-Okada et. al. rapporteras biofilminhibition hos alla testade mutansstreptokocker när tranbärspolyfenoler testades (27). Även in vivo visas ett minskat antal mutansstreptokocker efter sex veckors daglig användning av munvatten som innehåller tranbär (36), vilket möjligen kan tolkas som effekt på biofilmbildningen.

Liknande resultat presenterades om grönt te i en in vitro studie av Tsais et. al. (32). Studien kunde inte påvisa inhibitionseffekt på *S. mutans* tillväxt trots att grönt te har den högsta totala fenolmängden och antioxidantkapaciteten bland tolv olika växter. I en nyligen gjord studie om grönt te på agarplattor rapporteras däremot hämmande effekt på *S. mutans* tillväxt (37).

I den här studien visar humle ingen inhibitionseffekt på *S. mutans* biofilmbildning. Samma resultat framkommer i Tagashira et. al. studie (30). Däremot har Bhattacharya et. al. rapporterat att humlekomponenter (olika syror) har antibakteriella effekter på *S. mutans* (29). Även Shinada et. al. har i en klinisk studie rapporterat en signifikant minskning av mutansstreptokocker vid användning av munvatten som innehåller humle (31).

Tidigare studier om timjan (23,24) och lime (38) pekar också på hämning av *S. mutans* bakterietillväxt medan denna studie inte visar någon effekt av timjan och lime. Detta kan möjligtvis förklaras med att extrakten var för svaga.

Att kunna hämma *S. mutans* syraproduktion har varit ett populärt forskningsfält sedan länge. Syraproduktionshämningen skulle betyda minskat pH fall och emaljens och dentinets demineralisering skulle kunna bromsas. Studieresultatet avseende syraproduktionen visar att de testade växtextrakten, förutom timjan, har inhibitionseffekt på *S. mutans* syraproduktion. Växternas MIC på syraproduktion varierar från 100µl - 500µl växtextrakt. Även på bakteriernas syraproduktion visar tidigare studier varierande resultat. En in vivo studie om grönt te (20) och en in vitro studie om tranbärspolyfenoler (39) visar hämmande effekt på *S. mutans* syraproduktion. I föreliggande studien visar främst humle hämmande effekt på syraproduktion bland de testade växterna med en MIC på 100µl växtextrakt. Däremot fann Tagashira et. al. ingen inhibitionseffekt på *S. mutans* syraproduktion i en in vitro studie om humle (30).

En nyhet i denna studie är resultatet avseende aronia. Aronia liksom tranbär innehåller likartade polyfenoler (4), men har enligt litteraturen inte testats på kariogena bakterier. Aronia visar inhibitionseffekt på *S. mutans* biofilm liknande tranbär med MIC på 200µl växtextrakt. Aronias inhibitionseffekt på *S. mutans* syraproduktion är också tydlig. Vid en MIC på 300µl växtextrakt ligger aronia nära tranbärsresultatet som har en MIC på 200µl växtextrakt.

De testade växtextrakten visar varierande resultat på *S. mutans* avseende två utvalda egenskaper. Inget entydigt samband kan konstateras mellan växtextraktens effekt på *S. mutans* biofilmbildning och växtextraktens effekt på *S. mutans* syraproduktion. Kanel som

visar god biofilminhibitionsförmåga gav sämre resultat avseende inhibition av syraproduktion. Humle som inte visade någon hämmande effekt på biofilmbildning gav störst effekt på syraproduktionsinhibition. Användning av humle-, te-, lime- och tinjanextrakt gav inte inhibitionseffekt på biofilmbildning. Denna brist på samband mellan viktiga uttryck för bakteriernas vitalitet (i tidigare studier), biofilmbildning och syraproduktion tyder på att effekten av växtextrakt påverkar dessa egenskaper på olika sätt, i olika utsträckning och är oberoende av varandra.

Naturliga fenoler/polyfenoler är utpekade som starka kandidater med antikariogena egenskaper (10). Den här studien visar att växternas fenolmängd inte är direkt proportionell mot *S. mutans* biofilminhibition och inhibition på syraproduktion. Nejliska som har den högsta fenolhalt (2058 GAE mg/L) har åstadkommit samma biofilminhibition som aronia med betydligt mindre fenolhalt (288 GAE mg/L). Te som hade mycket högre fenolhalt (1569 GAE mg/L) än tranbär (302 GAE mg/L) och aronia (288 GAE mg/L) gav bakterietillväxt. Kanel som visade god biofilminhibition vid en hög fenolhalt (1796 GAE mg/L) gav ganska svag inhibition på syraproduktion. Det är tvärtom vid humle som vid en låg fenolhalt (197 GAE mg/L) visade dålig biofilminhibitionsförmåga men den största syraproduktionsinhibitionen. En tänkbar förklaring till de varierande resultaten kan vara att växter utöver fenoler/polyfenoler innehåller andra ämnen, t.ex. garvämnerna, bitterämnen, eteriska oljor, aminosyror, som har bakteriedödande eller inflammationshämmande egenskaper (8). Växterna/produkterna skulle också kunna innehålla bekämpningsmedel, konserveringsmedel, olika tillsatser och fluor (te). Dessa ämnen undersöktes inte i denna studie men de skulle ha kunnat påverka studieresultatet. En annan möjlig förklaring till de varierande resultaten kan ligga i att växter innehåller olika sorters fenoler/polyfenoler (19). I denna studie togs inte hänsyn till dessa kvalitativa delar, utan den totala fenolmängden mättes (kvantitativ mätning).

Vid användning av etanolbaserat växtextrakt har brunnarnas alkoholhalt varierat från 0,5% till 5%. Eftersom alkoholhalten är så låg har den sannolikt inte något större betydelse avseende resultatet. Vissa antiseptiska preparater ute på marknaden har mycket högre alkoholhalt (15,16).

De testade växtextrakten förutom humle var inte sterilfiltrerade. Därför skulle konkurrens från andra bakterier kunna föreligga. Eftersom antalet av *S. mutans* i startkulturen i varje brunn (ca. tvåhundrausen) var så hög har detta troligen inte en större påverkan.

Växtextraktens pH mättes inte i den här studien. De mängder av växtextrakt som användes i brunnar har inte orsakat - förutom tranbär 500 µl, fig. 4b - lägre pH än bakterierna gjorde (fig. 2b, 3b, 5b...9b). Skillnaden vid tranbär 500 µl skulle kunna förklaras med att extraktet troligen hade så lågt pH att det tillförde mera syra än vad bakterier kunde producera. Denna pH-sänkning påverkade sannolikt inte studieresultatet i stort eftersom tranbärs MIC ligger på 200 µl.

Studieresultatet och även tidigare studier visar stor variation på hur växter påverkar *S. mutans* olika egenskaper. Det är märkbart att växter har inhibitionseffekt på *S. mutans*, men verkningsmekanismerna är inte klarlagda. Studierna är designade och gjorda på varierande sätt, både in vivo och in vitro (agarplattor, näringslösning), och det är svårt att dra en entydig slutsats. Resultat på agarplattor ger inte samma resultat som när bakterier växer fritt i en näringslösning (planktonisk form) (40). Fördelen med hur denna studie designades

och utfördes är att förutsättningarna för biofilmbildning ligger lite närmare till vad som händer i munhålan. Det vill säga att biofilm som bildades i mikrotiterplattornas brunnar (artificiell plack) är mera lik plack som bildas på tänderna än planktoniska bakterier i en suspension.

Dagens forskning om karies har stor fokus på den ekologiska plackhypotesen, som innebär att bakterier under vissa förhållanden förändrar sina egenskaper och ger upphov till obalans i plackets mikroflora varvid sjukdom kan uppstå (14). I dagsläget (ur behandlingssynpunkt) är det stort fokus på att påverka orala och plackets mikrofloran genom att döda, utrota kariesbakterier med hjälp av olika antiseptiska medel (munskölj). Med tanke på studieresultatet och även på tidigare forskning skulle det rent hypotetiskt inte vara otänkbart att genom en varierande konsumtion av olika sorters växter kunna behålla balansen/homeostasen i den orala mikrofloran istället för att eliminera bakterier.

7. SLUTSATS

Denna studie visar att vissa av de testade växtextrakten har inhibitionseffekt på *S. mutans* biofilmbildning och syraproduktion. Växtextraktens inhibitionseffekter på *S. mutans* biofilmbildning och syraproduktion är oberoende av varandra. Växtextraktens inhibitionseffekter på *S. mutans* biofilmbildning och syraproduktion är inte relaterade till totalfenolmängden.

TACK

Stort tack till Peter Carlsson för all hjälp, sakkunnig-, stimulerande handledning, och goda råd i samband med studien. Tack till Kimmo Rumpunen forskare och växtförädlare vid SLU Balsgård som har sponsrat studien med aroniapulver.

8. REFERENSER

- (1) Wojdylo A, Oszmianski J, Czeremys R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry* 2007;105:940-949.
- (2) Cabrera C, Artacho R, Giménez R. Beneficial effects of Green Tea – A review. *Journal of the American College of Nutrition* 2006;25(2):79-99.
- (3) Chrubasik C, Li G, Chrubasik S. The clinical effectiveness of chokeberry: a systematic review. *Phytother Res* 2010 Aug;24(8):1107-1114.

- (4) Zheng W, Wang SY. Oxygen radical absorbing capacity of phenolics in blueberries, cranberries, chokeberries, and lingonberries. *J Agric Food Chem* 2003 Jan 15;51(2):502-509.
- (5) Zanolini P, Zavatti M. Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L. *J Ethnopharmacol* 2008 Mar 28;116(3):383-396.
- (6) Khan R, Islam B, Akram M, Shakil S, Ahmad A, Ali SM, et al. Antimicrobial activity of five herbal extracts against multi drug resistant (MDR) strains of bacteria and fungus of clinical origin. *Molecules* 2009 Feb 4;14(2):586-597.
- (7) Gerhauser C. Broad spectrum anti-infective potential of xanthohumol from hop (*Humulus lupulus* L.) in comparison with activities of other hop constituents and xanthohumol metabolites. *Mol Nutr Food Res* 2005 Sep;49(9):827-831.
- (8) 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 Complementary and Alternative Medicine* 2011; Article ID 680354: 15 pages.
- (9) Smullen J, Koutsou GA, Foster HA, Zumbo A, Storey DM. The antibacterial activity of plant extracts containing polyphenols against *Streptococcus mutans*. *Caries Res* 2007;41(5):342-349.
- (10) Ferrazzano GF, Amato I, Ingenito A, Zarrelli A, Pinto G, Pollio A. Plant polyphenols and their anti-cariogenic properties: a review. *Molecules* 2011 Feb 11;16(2):1486-1507.
- (11) Hamilton-Miller JM. Anti-cariogenic properties of tea (*Camellia sinensis*). *J Med Microbiol* 2001 Apr;50(4):299-302.
- (12) Tsai PJ, Tsai TH, Ho SC. In vitro inhibitory effects of rosmarinic acid on growth and glucosyltransferase activity of *Streptococcus sobrinus*. *Food Chemistry* 2007;105:311-316.
- (13) Hamada S, Slade HD. Biology, immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Rev* 44 1980:331-384.
- (14) Marsh P, D. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology* 2003;149:279-94.
- (15) Collaert B, Edwardsson S, Attström R, Hase JC, Aström M, Møvert R. Rinsing with delmopinol 0,2% and chlorhexidine 0,2%: short-term effect on salivary microbiology, plaque and gingivitis. *J Periodontol* 1992;63(7):618-25.
- (16) Fine DH, Furgang D, Barnett ML, Drew C, Steinberg L, Charles CH, et al. Effect of an essential oil-containing antiseptic mouthrinse on plaque and salivary *Streptococcus mutans* levels. *J Clin Periodontol* 2000;27:157-161.
- (17) Hannig C, Sorg J, Spitzmuller B, Hannig M, Al-Ahmad A. Polyphenolic beverages reduce initial bacterial adherence to enamel in situ. *J Dent* 2009 Jul;37(7):560-566.

- (18) Sato M, Fujiwara S, Tsuchiya H, Fujii T, Iinuma M, Tosa H, et al. Flavones with antibacterial activity against cariogenic bacteria. *J Ethnopharmacol* 1996 Nov;54(2-3):171-176.
- (19) Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2004;79:727-47.
- (20) Hirasawa M, Takada K, Otake S. Inhibition of acid production in dental plaque bacteria by green tea catechins. *Caries Res* 2006;40(3):265-270.
- (21) Rasheed A, Haider M. Antibacterial activity of *Camellia sinensis* extracts against dental caries. *Arch Pharm Res* 1998 Jun;21(3):348-352.
- (22) Antonio AG, Moraes RS, Perrone D, Maia LC, Santos KRN, Iório, N. L. P., et al. Species, roasting degree and decaffeination influence the antibacterial activity of coffee against *Streptococcus mutans*. *Food Chemistry* 2010;118:782-788.
- (23) Filoche SK, Soma K, Sissons CH. Antimicrobial effects of essential oils in combination with chlorhexidine digluconate. *Oral Microbiol Immunol* 2005 Aug;20(4):221-225.
- (24) Hammad M, Sallal AK, Darmani H. Inhibition of *Streptococcus mutans* adhesion to buccal epithelial cells by an aqueous extract of *Thymus vulgaris*. *Int J Dent Hyg* 2007 Nov;5(4):232-235.
- (25) Daglia M, Stauder M, Papetti A, Signoretto C, Giusto G, Canepari P, et al. Isolation of red wine components with anti-adhesion and anti-biofilm activity against *Streptococcus mutans*. *Food Chemistry* 2010;119:1182-1188.
- (26) Bodet C, Grenier D, Chandad F, Ofek I, Steinberg D, Weiss EI. Potential oral health benefits of cranberry. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2008 Aug;48(7):672-680.
- (27) Yamanaka-Okada A, Sato E, Kouchi T, Kimizuka R, Kato T, Okuda K. Inhibitory effect of cranberry polyphenol on cariogenic bacteria. *Bull Tokyo Dent Coll* 2008 Aug;49(3):107-112.
- (28) Ferrazzano GF, Amato I, Ingenito A, De Natale A, Pollio A. Anti-cariogenic effects of polyphenols from plant stimulant beverages (cocoa, coffee, tea). *Fitoterapia* 2009;80:255-262.
- (29) Bhattacharya S, Virani S, Zavro M, Haas GJ. Inhibition of *Streptococcus mutans* and other oral *Streptococci* by Hop (*Humulus L.*). *Economic Botany* 2003;57(1):118-125.
- (30) Tagashira M, Uchiyama K, Yoshimura T, Shiota M, Uemitsu N. Inhibition by hop bract polyphenols of cellular adherence and water-insoluble glucan synthesis of *mutans streptococci*. *Biosci Biotechnol Biochem* 1997 Feb;61(2):332-335.
- (31) Shinada K, Tagashira M, Watanabe H, Sopapornamorn P, Kanayama A, Kanda T, et al. Hop bract polyphenols reduced three-day dental plaque regrowth. *J Dent Res* 2007 Sep;86(9):848-851.

- (32) Tsai TH, Tsai TH, Chien YC, Lee CW, Tsai PJ. In vitro antimicrobial activities against cariogenic streptococci and their antioxidant capacities: A comparative study of green tea versus different herbs. *Food Chemistry* 2008;110:859-864.
- (33) Cai L, Wu CD. Compounds from *Syzygium aromaticum* possessing growth inhibitory activity against oral pathogens. *J Nat Prod* 1996 Oct;59(10):987-990.
- (34) Oszmianski J, Wojdylo A. Aronia melanocarpa phenolics and their antioxidant activity. , *Eur Food Res Technol* 2005;221:809-813.
- (35) Slinkard K, Singleton VL. Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods. *American Journal of Enology and Viticulture* 1977;28:49-55.
- (36) Weiss EI, Kozlovsky A, Steinberg D, Lev-Dor R, Bar Ness Greenstein R, Feldman M, et al. A high molecular mass cranberry constituent reduces mutans streptococci level in saliva and inhibits in vitro adhesion to hydroxyapatite. *FEMS Microbiol Lett* 2004 Mar 12;232(1):89-92.
- (37) Naderi NJ, Niakan M, Kharazi Fard MJ, Zardi S. Antibacterial Activity of Iranian Green and Black Tea on Streptococcus Mutans: An In Vitro Study. *Journal of Dentistry, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran* 2011;8:No.2.
- (38) Owhe-Ureghe UB, Ehwarieme DA, Eboh DO. Antibacterial activity of garlic and lime on isolates of extracted carious teeth. *African Journal of Biotechnology* 2010;9(21):3163-3166.
- (39) Duarte S, Gregoire S, Singh AP, Vorsa N, Schaich K, Bowen WH, et al. Inhibitory effects of cranberry polyphenols on formation and acidogenicity of Streptococcus mutans biofilms. *Federation of European Microbiological Societies* 2006;257:50-56.
- (40) J. Neilands. Acid tolerance of streptococcus mutans biofilms. Holmbergs, Malmö: Malmö University, Faculty of Odontology Department of Oral Biology; 2007.