

## 치아우식증 및 치주질환 원인균에 대한 Carvacrol의 항균효과

박순남<sup>1†</sup> · 이동균<sup>2†</sup> · 임윤경<sup>1</sup> · 김화숙<sup>3</sup> · 조유진<sup>1</sup> · 김동춘<sup>4</sup> · 김생곤<sup>5</sup> · 국중기<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>조선대학교 치과대학 구강생화학교실, <sup>2</sup>조선대학교 치과보존학교실, <sup>3</sup>전남과학대학 치위생과,  
<sup>4</sup>중국 연변대학교 농학원 동물의학교실, <sup>5</sup>조선대학교 치과대학 인체생물학교실

### Antimicrobial Effect of Carvacrol against Cariogenic and Periodontopathic Bacteria

Soon-Nang Park<sup>1†</sup>, Dongkyun Lee<sup>2†</sup>, Yun Kyong Lim<sup>1</sup>, Hwa-Sook Kim<sup>3</sup>,  
Eugene Cho<sup>1</sup>, Dongchun Jin<sup>4</sup>, Saeng-Gon Kim<sup>5</sup>, and Joong-Ki Kook<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Oral Biochemistry and <sup>2</sup>Department of Conservative Dentistry, School of Dentistry,  
Chosun University, Gwangju 501-759, Republic of Korea

<sup>3</sup>Department of Dental Hygiene, Chunnam Techno College, Gokseong-gun 516-911, Republic of Korea

<sup>4</sup>Department of Veterinary Medicine, College of Agriculture, Yanbian University, Jilin Province 133002, P. R. China

<sup>5</sup>Department of Human Biology, School of Dentistry, Chosun University, Gwangju 501-759, Republic of Korea

(Received February 13, 2012 / Accepted March 21, 2012)

The aim of this study was to evaluate the antimicrobial effect of carvacrol against periodontopathic and cariogenic bacteria and its cytotoxicity in human oral tissue cells. We tested their antibacterial properties against mutans streptococci and five major periodontopathic bacterial species involved in periodontal disease. The antimicrobial activity was evaluated by the minimal inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC). The cell viability of carvacrol on normal human gingival fibroblast (NHGF) cells was tested by methyl thiazolyl tetrazolium assay. The data showed that carvacrol had remarkable antimicrobial effect on tested bacteria with a MIC and MBC values ranged from 16 to 128 µg/ml and from 32 to 128 µg/ml, respectively. In cell toxicity studies, carvacrol had significantly decreased cell viability when NHGF cells were treated at 128 µg/ml. These findings suggest that carvacrol has a strong antimicrobial activity against periodontopathic and cariogenic bacteria. However, in order to use it as a component of gargling solution or toothpaste, its concentration should be below 64 µg/ml and other compounds having an antimicrobial activity against periodontopathic and cariogenic bacteria should be used together.

**Keywords:** antimicrobial effect, carvacrol, mutans streptococci, periodontopathogens

구강 건강과 관련하여 전세계적으로 문제가 되고 있는 구강 질환은 치아우식증과 치주질환이다(Board of Trustees of the American Academy of Periodontology, 2000). 최신 WHO의 보고에 따르면 치아우식증과 치주질환은 전세계 성인 인구의 약 60%에서 발병하는 것으로 보고되었다(Petersen, 2003, 2004). 이와 같은 구강질환을 일으키는 일차적 원인은 치면세균막 내에 존재하는 세균으로 알려져 있다(Marsh, 1992).

치아우식증은 치면세균막 내에 존재하는 세균들의 당질 대사 산물인 젖산 등의 유기산에 의해 치아의 법랑질이 탈회되면서 발생하며, 이러한 세균들 중에서 *Streptococcus mutans*와 *S.*

*sobrinus*를 포함하는 뮤탄스 그룹 연쇄상구균(뮤탄스 연쇄상구균)들로 보고되었다(Loesche, 1986). 치주질환은 치은연하치면세균막에 존재하는 *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum* 등의 그람 음성 혐기성 세균 종으로 알려져 있다(Haffajee and Socransky, 1994; Darveau *et al.*, 1997).

구강 내 세균의 성장을 억제하면서 구강질환을 예방하기 위해 광범위하게 사용되는 화합물로는 클로르헥시딘(chlorhexidine), 불소화합물, xylitol 및 sorbitol 등이 있다. 클로르헥시딘은 그람 음성 세균을 억제하기 위해 치주치료 시 사용되는 항생물질로써, 부작용으로 치아 및 보철물에 착색을 일으키고, 미각 이상 및 구강점막의 작열감을 유발시킨다(Tredwin *et al.*, 2005). 불소화합물은 치아우식증 유발 세균을 억제하기 위해 가장 많이 사용되고 있으나, 과도한 섭취 시 복통과 반점치 및 암을 유발할 수

<sup>†</sup>These authors contributed equally to this work.

\*For correspondence. E-mail: jkkook@chosun.ac.kr; Tel.: +82-62-230-6877; Fax: +82-62-224-3706

있다(Spencer and Do, 2008). 당 대체 물질인 xylitol과 sorbitol 등은 치아우식증 유발 세균이 당 대사에 이용되지 못하고 그대로 배출시킴으로써 저우식 유발성이 확인되었으나 한꺼번에 대량 섭취 시 설사를 일으키고, 가격이 비싸다는 단점이 있다. 특히 xylitol을 장기간 섭취 시 이에 대한 내성 균주가 빈번히 발생하여 항우식 효과가 떨어진다고 보고되었다(Assev *et al.*, 2002). 이러한 화합물들은 구강질환을 예방하는데 여러 가지 문제점을 가지고 있어 최근에는 구강병을 예방하는 데 부작용이 적고, 장기간 안정하게 사용할 수 있는 천연 추출물을 이용하는 연구가 증가되고 있다.

Carvacrol[2-methyl-5(1-methylethyl)phenol]은 oregano 정유(essential oil)의 주성분으로 향료의 원료 및 강력한 살균제로 작용한다(Lambert *et al.*, 2001). Carvacrol은 항염증제, 항산화제, 간장 보호 및 항종양제 등 여러 생물학적 작용을 가지고 있고(Aeschbach *et al.*, 1994; Weber and de Bont, 1996; Skold *et al.*, 1998; Alam *et al.*, 1999; Zeytinoglu *et al.*, 2003; Robledo *et al.*, 2005), 최근 연구에 의하면 치아우식증의 원인균인 *S. mutans*의 성장을 억제하는 항균력을 가지고 있는 것으로 보고되었다(Botelho *et al.*, 2007). 그러나 현재까지 치주병원성 세균들과 치아우식증을 유발시키는 *S. sobrinus*에 대한 carvacrol의 항균능에 대한 연구들과 구강조직 세포들에 대한 독성 실험은 거의 없는 실정이다.

그러므로 본 연구는 치아우식증 및 치주질환 원인균들에 대한 carvacrol의 항균능을 알아보고, 사람의 구강조직 세포에서 carvacrol의 세포 생존율을 조사하여 가글린제 및 치약 등의 구강위생용품의 항균 성분으로 사용 가능함을 알아보기 위하여 실시하였다.

본 연구에 사용된 17개 표준균주는 *P. gingivalis* ATCC 33277<sup>T</sup>, *P. gingivalis* ATCC 49417, *P. gingivalis* ATCC 53978, *P. intermedia* ATCC 25611<sup>T</sup>, *P. intermedia* ATCC 49046, *P. nigrescens* ATCC 33563<sup>T</sup>, *P. nigrescens* ATCC 25261, *F. nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC 25586<sup>T</sup>, *F. nucleatum* subsp. *polymorphum* ATCC 10953<sup>T</sup>, *F. nucleatum* subsp. *vincentii* ATCC 49046<sup>T</sup>, *F. nucleatum* subsp. *fusiforme* ATCC 51190<sup>T</sup>, *F. nucleatum* subsp. *animalis* ATCC 51191<sup>T</sup>, *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384<sup>T</sup>, *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43717, *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43718, *S. mutans* ATCC 25175<sup>T</sup> 및 *S. sobrinus* ATCC 33478<sup>T</sup>으로 American Type Culture Collection (ATCC, USA)에서 구입하여 사용하였다. 또한 한국인의 구강에서 분리 동정된 11균주의 *S. mutans* (KCOM 1054, KCOM 1111, KCOM 1113, KCOM 1116, KCOM 1126, KCOM 1128, KCOM 1136, KCOM 1197, KCOM 1202, KCOM 1207, KCOM 1217) 및 3균주의 *S. sobrinus* (KCOM 1157, KCOM 1196, KCOM 1221)들은 한국 구강미생물자원은행(Korean Collection for Oral Microbiology; KCOM, Korea)에서 분양 받아 사용하였다. 연쇄상구균들을 제외한 세균들은 Tryptic Soy broth에 0.5% yeast extract, 0.05% cysteine HCl-H<sub>2</sub>O, 0.5 mg/ml hemin 및 2 µg/ml vitamin K<sub>1</sub>가 포함된 선택배지에서 37°C anaerobic chamber [(Bactron I,

Sheldon Manufacturing Inc., USA), (10% H<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, and 85% N<sub>2</sub>)] 조건에서 배양하였다. 연쇄상구균들은 Todd Hewitt (Difco Lab., USA) 한천배지에 도말하여 37°C, 10% CO<sub>2</sub> 세균 배양기에서 배양하였다.

최소성장억제농도(Minimum Inhibitory Concentration, MIC) 및 최소살균농도(Minimum Bactericidal Concentration, MBC) 측정에는 NCCLS standard (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2000)에 따라 microdilution하여 분석하였다. 본 연구에 사용된 세균들은 선택배지를 이용하여 37°C 세균배양기에서 24시간 배양한 후, 1×10<sup>6</sup> CFU/ml가 되도록 희석하여 96-well plate에 분주하였다. Carvacrol (Sigma, USA)은 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 및 128 µg/ml가 되도록 세균배양액에 첨가(세균배양액의 1%가 되도록 첨가)하였다. 이때 carvacrol은 Dimethyl Sulfoxide (DMSO; Sigma)에 녹여 사용하였다. 실험의 음성대조군은 DMSO를 사용하였고, 양성대조군은 ampicillin (100 µg/ml)를 사용하여 세균배양액의 1%가 되도록 첨가하였다. 96-well plate에 분주된 세균배양액은 24시간 배양한 후 MIC를 측정하였다. MBC는 위의 세균배양액을 10 µl 취하여 10<sup>2</sup> 및 10<sup>4</sup>배 희석하였고, 한천배지에 도말하여 24시간 동안 37°C 세균배양기에서 배양한 후 형성된 균락을 계수화하여 측정하였다. 각 반응은 모두 세 번 반복하여 평균하였다.

정상 사람 치은섬유모세포는 조선대학교 치과대학 장현선 교수로부터 분양 받아 사용하였고, Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM, Gibco BRL, USA)에 10% Fetal Bovine Serum (PAA Laboratories, Canada), 100 U/ml penicillin 및 100 µg/ml streptomycin (Gibco BRL)이 혼합된 세포배양액을 37°C, 5% CO<sub>2</sub>가 첨가된 세포배양기에서 배양하였다.

MTT[3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, a tetrazole] 분석법은 NHGF 세포에 carvacrol의 세포 독성을 평가하기 위해 실시하였다. 24-well plate에 80% NHGF 세포가 함유되도록 분주하고, 16, 32, 64, 128 및 256 µg/ml의 carvacrol 용액 및 음성대조군인 배지만 첨가한 균과 DMSO가 1% 함유된 세포배양액을 각각의 well에 분주하여, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 세포 배양기에서 24시간 배양하였다. 그 다음 기존의 세포배양액을 모두 제거하고, 10% MTT 용액(Sigma)이 첨가된 배지를 각 well에 분주하여 동일한 조건에서 3시간 동안 배양하였다. 이후 반응액을 제거하고, Isopropanol (Sigma)을 각 well에 300 µl 씩 첨가하여 잘 흔들어 준 후 96-well plate에 200 µl 씩 분주하여 파장 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때 실험군 및 대조군은 각각 3 well씩 배정하였고, 이를 각각 3회 반복 실험하였다.

치주질환 원인균 5종에 대한 carvacrol의 MIC 및 MBC 값은 모두 32–128 µg/ml 이었다(Table 1). Carvacrol은 *P. gingivalis* ATCC 33277<sup>T</sup>, *P. nigrescens* ATCC 33563<sup>T</sup>, *P. nigrescens* ATCC 25261, *F. nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC 25586<sup>T</sup> 및 *F. nucleatum* subsp. *animalis* ATCC 51191<sup>T</sup>를 제외하고, 나머지 치주질환 원인균에서는 64 µg/ml 이하의 농도에서 감수성을 보였다(Table 1). *P. gingivalis*와 *F. nucleatum*은 carvacrol에 대한 감수성이 균주마다 차이를 보였고, *P. intermedia*, *P. nigrescens* 및 *A. actinomycetemcomitans*는 종(species)별로 동

**Table 1.** Antimicrobial effects of carvacrol against periodontopathogens

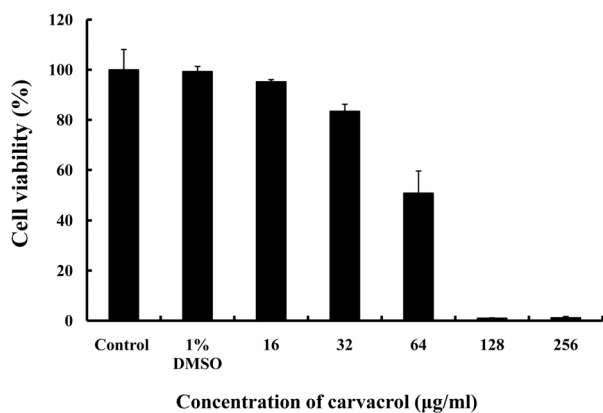
| Species and strains   | MIC<br>( $\mu\text{g/ml}$ ) | MBC<br>( $\mu\text{g/ml}$ ) |
|---|-----------------------------|-----------------------------|
| <i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277 <sup>T</sup>                           | 128                         | 128                         |
| <i>P. gingivalis</i> ATCC 49417   | 32                          | 128                         |
| <i>P. gingivalis</i> ATCC 53978   | 32                          | 64                          |
| <i>Prevotella intermedia</i> ATCC 25611 <sup>T</sup>                              | 64                          | 64                          |
| <i>P. intermedia</i> ATCC 49046   | 64                          | 64                          |
| <i>Prevotella nigrescens</i> ATCC 33563 <sup>T</sup>                              | 128                         | 128                         |
| <i>P. nigrescens</i> ATCC 25261   | 128                         | 128                         |
| <i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp.<br><i>nucleatum</i> ATCC 25586 <sup>T</sup> | 128                         | 128                         |
| <i>F. nucleatum</i> subsp. <i>polymorphum</i> ATCC 10953 <sup>T</sup>             | 64                          | 64                          |
| <i>F. nucleatum</i> subsp. <i>vincentii</i> ATCC 49046 <sup>T</sup>               | 32                          | 32                          |
| <i>F. nucleatum</i> subsp. <i>fusiforme</i> ATCC 51190 <sup>T</sup>               | 64                          | 64                          |
| <i>F. nucleatum</i> subsp. <i>animalis</i> ATCC 51191 <sup>T</sup>                | 128                         | 128                         |
| <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i><br>ATCC 33384 <sup>T</sup>           | 64                          | 128                         |
| <i>A. actinomycetemcomitans</i> ATCC 43717  | 64                          | 128                         |
| <i>A. actinomycetemcomitans</i> ATCC 43718  | 64                          | 128                         |

ATCC, America Type Culture Collection

일한 농도에서 감수성을 보였다(Table 1).

임상분리 균주인 *S. mutans* KCOM 1136과 *S. sobrinus* KCOM 1157을 제외하고, 본 연구에 사용된 모든 뮤탄스 연쇄상구균에 대한 carvacrol의 MIC 및 MBC 값은 128  $\mu\text{g/ml}$ 로 동일하였다(Table 2). 최근 Botelho 등(2007)의 연구에 의하면 carvacrol의 항균작용은 *S. mutans* ss-980 균주에 대해 MIC와 MBC 값은 각각 2.5 mg/ml 및 5.0 mg/ml를 보였다. 그러나 Hwang 등(2004)의 연구에서는 *S. mutans* ATCC 25175<sup>T</sup>의 MIC와 MBC 값이 각각 125  $\mu\text{g/ml}$  및 25  $\mu\text{g/ml}$ 인 것으로 보고하였다. 이러한 결과의 차이는 실험된 carvacrol의 순도의 차이 또는 사용된 뮤탄스 연쇄상구균 균주들의 숙주 차이에 따라 carvacrol의 감수성 차이가 있기 때문일 것으로 생각된다.

Carvacrol이 NHGF 세포의 생존에 미치는 영향을 알아보기

**Fig. 1.** Effects of carvacrol on the cell viability of NHGF cells.**Table 2.** Antimicrobial effects of carvacrol against mutans streptococci

| Species and strains                                   | MIC<br>( $\mu\text{g/ml}$ ) | MBC<br>( $\mu\text{g/ml}$ ) |
|---|-----------------------------|-----------------------------|
| <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 <sup>T</sup>   | 128                         | 128                         |
| <i>S. mutans</i> KCOM 1054                            | 128                         | 128                         |
| <i>S. mutans</i> KCOM 1111                            | 128                         | 128                         |
| <i>S. mutans</i> KCOM 1113                            | 128                         | 128                         |
| <i>S. mutans</i> KCOM 1116                            | 128                         | 128                         |
| <i>S. mutans</i> KCOM 1126                            | 128                         | 128                         |
| <i>S. mutans</i> KCOM 1128                            | 128                         | 128                         |
| <i>S. mutans</i> KCOM 1136                            | 16                          | 32                          |
| <i>S. mutans</i> KCOM 1197                            | 128                         | 128                         |
| <i>S. mutans</i> KCOM 1202                            | 128                         | 128                         |
| <i>S. mutans</i> KCOM 1207                            | 128                         | 128                         |
| <i>S. mutans</i> KCOM 1217                            | 128                         | 128                         |
| <i>Streptococcus sobrinus</i> ATCC 33478 <sup>T</sup> | 128                         | 128                         |
| <i>S. sobrinus</i> KCOM 1157                          | 64                          | 64                          |
| <i>S. sobrinus</i> KCOM 1196                          | 128                         | 128                         |
| <i>S. sobrinus</i> KCOM 1221                          | 128                         | 128                         |

ATCC, America Type Culture Collection; KCOM, Korean Collection for Oral Microbiology.

위해 MTT 분석법을 실시한 결과 carvacrol 128  $\mu\text{g/ml}$  농도에서는 0.3%의 세포생존율을 보였고, 64  $\mu\text{g/ml}$ 에서는 50.8%의 생존율을 보였다(Fig. 1).

천연물에서 추출한 정유는 세균의 세포벽 파괴, 세포의 효소 활성 억제 및 특정 조절유전자의 단백질 합성 억제 등을 통해 항균작용을 갖는 것으로 보고되었다(Fine, 1988; Kubert et al., 1993; Qiu et al., 2011). Carvacrol 역시도 이와 비슷한 기전으로 본 연구에 사용된 세균들에 대한 항균 작용과 NHGF 세포에 대한 독성을 보이는 것으로 생각된다. Carvacrol은 NHGF 세포에 128  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 1.0%의 세포생존율을 보여 강한 세포독성을 가지는 것으로, 구강위생용품에 단독으로 사용하기에는 어려울 것으로 생각된다(Fig. 1). 다양한 천연물에서 추출된 정유의 항균능은 단일 성분에 의한 효과보다 클로르헥시딘 및 항생제 등과 함께 혼합되어 사용될 때 상승작용을 갖는 것으로 보고되었다(Sousa et al., 2010; Solórzano-Santos and Miranda-Novales, 2011). 하지만, 클로르헥시딘 및 항생제는 장기간 사용시 부작용이 크기 때문에 다른 항균 물질을 사용하는 것이 바람직하다고 생각된다.

구강조직세포는 *in vitro* 보다 *in vivo* 상태에서 화합물에 좀 더 저항성을 가지게 되는데, 그 이유는 구강조직세포가 *in vivo* 상태에서는 혈액을 통해 영양분을 지속적으로 공급 받을 수 있어 재생능이 더욱 뛰어나기 때문이다(Kim et al., 2011). 반면에 구강세균은 바이오 필름을 형성하기 때문에 부유세균에 대해 항균력을 나타내는 농도보다 더 높은 농도의 항균제가 필요하다고 본다. 그러므로, 추후 연구에서는 carvacrol의 효과와 안정성을 *in vivo*로 실험할 수 있는 방법에 관한 연구 및 세균 바이오 필름 모델을 이용한 연구가 필요할 것으로 여겨진다.

최근의 보고에 의하면, 치주조직은 세균과 그 생성물, 염증과 면역 매개체들의 저장고 역할을 담당하고 있어 그 영향이 혈관을 통해 다른 신체기관에 작용하게 됨으로써 당뇨, 임산부의 저체중아 출산 및 심혈관계 질환의 위험요인이 될 수 있음을 제안하였고 그에 따른 치주조직관리의 중요성을 강조하였다(Board of Trustees of the American Academy of Periodontology, 2000). 본 연구 결과 carvacrol은 치주질환 원인균 및 치아우식증 유발 세균 종에 대한 항균작용이 우수한 것으로 나타났다. 따라서 치면세균막을 형성하는 세균을 억제하기 위해 사용되는 penicillin, vancomycin 및 tetracycline 등의 항생제는 빈번하게 사용할 경우 내성을 유발할 수 있으므로 이러한 항생제의 단점을 극복하기 위한 대체제로 천연추출물인 carvacrol을 사용하면 치아우식증 및 치주질환을 예방하는데 도움이 될 수 있을 것으로 생각된다.

이상의 결과를 종합하면, carvacrol은 치아우식증과 치주질환 원인균에 대한 항균작용이 뛰어나지만, 구강조직 세포에 대해 세포독성을 가지고 있어 가글린제 및 치약 등의 구강양치용액에 활용하기 위해서는 64 µg/ml 이하의 농도로 사용하고 구강조직 세포에 대한 독성이 없는 다른 항균물질과 혼합하여 사용하는 것이 효과적인 것으로 생각된다.

## 적요

본 연구는 치아우식증 및 치주질환 원인균들에 대한 carvacrol의 항균능을 알아보고, 사람의 구강조직 세포에서 세포의 생존율을 분석하여 세포독성 정도를 알아보기 위해 실시하였다. Carvacrol의 항균능은 뮤탄스 연쇄상구균과 5종류의 치주질환 원인균을 이용하여 MIC 및 MBC 값을 측정하여 분석하였고, 세포생존율은 정상 사람 치은섬유모세포를 이용하여 MTT 분석법으로 평가하였다. 구강질환 원인균에 대한 carvacrol의 MIC 및 MBC 값은 각각 16–128 µg/ml과 32–128 µg/ml이었다. 세포독성 실험 결과 carvacrol은 128 µg/ml 농도에서 세포생존율이 현저히 감소하였다. 따라서 carvacrol은 치아우식증과 치주질환 원인균에 대한 항균작용이 뛰어나지만, 구강조직 세포에 대해 세포독성을 가지고 있어 가글린제 및 치약 등의 구강위생용품에 활용하기 위해서는 64 µg/ml 이하의 농도로 사용하고 정상 사람 치은섬유모세포에 대한 독성이 없는 다른 항균물질과 혼합하여 사용하는 것이 효과적인 것으로 생각된다.

## 감사의 말

본 연구는 보건복지가족부 보건의료기술진흥사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(과제고유번호: A100960).

## 참고문헌

Aeschbach, R., Loliger, J., Scott, B.C., Murcia, A., Butler, J., Halliwell, B., and Aruoma, O.I. 1994. Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. *Food*

- Chem. Toxicol.* **32**, 31–36.
- Alam, K., Nagi, M.N., Badary, O.A., Al-Shabanah, O.A., Al-Rikabi, A.C., and Al-Bekairi, A.M. 1999. The protective action of thymol against carbon tetrachloride hepatotoxicity in mice. *Pharmacol. Res.* **40**, 159–163.
- Assev, S., Stig, S., and Scheie, A.A. 2002. Cariogenic traits in xylytol-resistant and xylytol-sensitive mutans streptococci. *Oral Microbiol. Immunol.* **17**, 95–99.
- Board of Trustees of the American Academy of Periodontology. 2000. Parameter on systemic conditions affected by periodontal disease. *J. Periodontol.* **71**, 880–883.
- Botelho, M.A., Nogueira, N.A., Bastos, G.M., Fonseca, S.G., Lemos, T.L., Matos, F.J., Montenegro, D., Heukelbach, J., Rao, V.S., and Brito, G.A. 2007. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **40**, 349–356.
- Darveau, R.P., Tanner, A., and Page, R.C. 1997. The microbial challenge in periodontitis. *Periodontol.* **2000**, **14**, 12–32.
- Fine, D.H. 1988. Mouthrinses as adjuncts for plaque and gingivitis management. A status report for the American Journal of Dentistry. *Am. J. Dent.* **1**, 259–263.
- Haffajee, A.D. and Socransky, S.S. 1994. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol.* **2000**, **5**, 78–111.
- Hwang, J.K., Chung, J.Y., Baek, N.I., and Park, J.H. 2004. Isopanduratin A from *Kaempferia pandurata* as an active antibacterial agent against cariogenic *Streptococcus mutans*. *Int. J. Antimicrob. Agents* **23**, 377–381.
- Kim, M.J., Kim, C.S., Kim, B.H., Ro, S.B., Lim, Y.K., Park, S.N., Cho, E., Ko, J.H., Kwon, S.S., Ko, Y.M., and et al. 2011. Antimicrobial effect of Korean propolis against the mutans streptococci isolated from Korean. *J. Microbiol.* **49**, 161–164. Erratum in: *J. Microbiol.* **49**, 327.
- Kubert, D., Rubin, M., Barnett, M.L., and Vincent, J.W. 1993. Antiseptic mouthrinse-induced microbial cell surface alterations. *Am. J. Dent.* **6**, 277–279.
- Lambert, R.J., Skandamis, P.N., Coote, P.J., and Nychas, G.J. 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol.* **91**, 453–462.
- Loesche, W.J. 1986. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol. Rev.* **50**, 353–380.
- Marsh, P.D. 1992. Microbiological aspects of the chemical control of plaque and gingivitis. *J. Dent. Res.* **71**, 1431–1438.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2000. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: Approved Standard M7-A5. NCCLS, Wayne, PA, USA.
- Petersen, P.E. 2003. The World Oral Health Report 2003: continuous improvement of oral health in the 21st century—the approach of the WHO Global Oral Health Programme. *Community Dent. Oral Epidemiol.* **31**, 3–24.
- Petersen, P.E. 2004. Challenges to improvement of oral health in the 21st century the approach of the WHO Global Oral Health Programme. *Int. Dent. J.* **54**, 329–343.
- Qiu, J., Zhang, X., Luo, M., Li, H., Dong, J., Wang, J., Leng, B., Wang, X., Feng, H., Ren, W., and Deng, X. 2011. Subinhibitory concentrations of perilla oil affect the expression of secreted virulence factor genes in *Staphylococcus aureus*. *PLoS One* **6**, e16160.
- Robledo, S., Osorio, E., Munoz, D., Jaramillo, L.M., Restrepo, A., Arango, G., and Velez, I. 2005. *In vitro* and *in vivo* cytotoxicities and

- antileishmanial activities of thymol and hemisynthetic derivatives. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 1652–1655.
- Skold, K., Twetman, S., Hallgren, A., Yucel-Lindberg, T., and Modeer, T.** 1998. Effect of a chlorhexidine/thymol-containing varnish on prostaglandin E2 levels in gingival crevicular fluid. *Eur. J. Oral Sci.* **106**, 571–575.
- Solórzano-Santos, F. and Miranda-Novales, M.G.** 2011. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Curr. Opin. Biotechnol.* doi:10.1016/j.copbio.2011.08.005.
- Sousa, E.O., Silva, N.F., Rodrigues, F.F., Campos, A.R., Lima, S.G., and Costa, J.G.** 2010. Chemical composition and resistance-modifying effect of the essential oil of *Lantana camara*. *Linn. Pharmacogn. Mag.* **6**, 79–82.
- Spencer, A.J. and Do, L.G.** 2008. Changing risk factors for fluorosis among South Australian children. *Community Dent. Oral Epidemiol.* **36**, 210–218.
- Tredwin, C., Scully, C., and Bagan-Sebastian, J.** 2005. Drug-induced disorders of teeth. *J. Dent. Res.* **84**, 596–602.
- Weber, F.J. and de Bont, J.A.** 1996. Adaptation mechanisms of microorganisms to the toxic effects of organic solvents on membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* **1286**, 225–245.
- Zeytinoglu, H., Incesu, Z., and Baser, K.H.** 2003. Inhibition of DNA synthesis by carvacrol in mouse myoblast cells bearing a human N-RAS oncogene. *Phytomedicine* **10**, 292–299.