Archive Of SID

مجله علوم پزشکی رازی دوره ۲۳، شماره ۱۵۲، بهمن ۱۳۹۵ http://rjms.iums.ac.ir مقاله پژوهشی

اثر ضد میکروبی عصاره مرزه در تشکیل بیوفیلم در برخی پاتوژن‌های باکتریال مهم انسان

*اسماء تیموری: کارشناس ارشد زیست شناسی گرایش میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد واحد کرمان، کرمان، ایران (*نویسنده مسئول).teymuri.as@gmail.com
محمد بکائیان: متخصص میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران. bokaeian.m@gmail.com
سید امین پاپلی برواتی: کارشناس ارشد تربیت بدنی گرایش فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه آزاد واحد کرمان، کرمان، ایران. S.a.papoli@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۵/۶/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۵/۹/۱۵

چکیده

زمینه و هدف: امروزه با افزایش استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و نیز شیوع سویه‌های مقاوم، خلاء ناشی از کاربرد داروهای ضد میکروبی جدید که دارای اثرات جانبی کمتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها باشند، احساس شده و از عصاره‌های گیاهی برای از بین بردن آن‌ها استفاده می‌شود. مرزه از گیاهان دارویی است که در طب سنتی کاربرد دارد. در این مطالعه، اثر عصاره مرزه در تشکیل بیوفیلم در برخی پاتوژن‌های باکتریال مهم انسان مورد بررسی قرار گرفته است.

روش کار: در این مطالعه آزمایشگاهی از گیاه مرزه (Satureja hortensis) برای بررسی اثرات ضد میکروبی آن استفاده شد. عصاره مرزه با غلظت‌های ۵۰ppm، ۲۵ppm و ۱۲/۵ppm تهیه و به روش انتشار چاهک روی سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس، استرپتوکوکوس پیوژنز، استرپتوکوکوس پنومونیه، استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس و پروتئوس میرابیلیس بررسی گردید. تست کمترین غلظت مهارکنندگی و بیش‌ترین غلظت مهارکنندگی به روش میکروتیترپلیت تعیین شد. عصاره مرزه نیز به روش ماسراسیون تهیه گردید.

یافته‌ها: کمترین غلظت مهارکنندگی (Minimum inhibitory concentration -MIC) در حدود ۵۰ppm- ۱۲/۵ مشاهده شد. بیش‌ترین غلظت مهارکنندگی در برابر باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و کمترین غلظت مهارکنندگی غلظت عصاره مرزه ppm ۱۲/۵ بوده که در برابر پروتئوس میرابیلیس مشاهده شد. همچنین این مطالعه نشان داد که میزان جذب (OD) برای تشکیل بیوفیلم باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در غلظت ۵۰ppm عصاره مرزه به مقدار صفر بود.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که عصاره مرزه ممکن است به تنهایی برای درمان عفونت‌های باکتریایی مفید باشد.

کلیدواژه‌ها: بیوفیلم، ضدباکتری، عصاره مرزه، پاتوژن‌های انسانی

مقدمه

جمعیت‌های متشکل از یک گونه یا گونه‌های متنوع باکتری به‌صورت چسبیده به یکدیگر و یا به سطوح زنده و غیرزنده در زمینه‌ای از پلی ساکاریدهای خارج سلولی بیوفیلم نامیده می‌شود. توسعه بیوفیلم یک فرآیند پیچیده است که نیازمند رفتارهای جمعی باکتری می‌باشد و در مقایسه با زندگی منفرد فواید زیادی را برای باکتری در بر دارد (۱). مراحل تشکیل بیوفیلم شامل اتصال ابتدایی برگشت‌پذیر و برگشت‌ناپذیر به سطوح، تشکیل میکروکلنی‌ها و در نهایت بلوغ میکروکلنی همراه با تشکیل اگزوپلی ساکاریدها (EPS) می‌باشد (۲). بیوفیلم می‌تواند بر روی سطوح مختلفی تشکیل شود (۳). از این رو به دلیل تنوع در اتصال به سطوح در زمینه‌های زیادی ازجمله صنعت از اهمیت خاصی برخوردار می‌باشند (۴ و ۵). می‌توان گفت که اتصالات و ارتباطات سطحی اولیه بین میکروارگانیسم‌ها با سطح و با میکروارگانیسم‌های دیگر نقش اساسی در گسترش بیوفیلم بازی می‌کند. گسترش بیوفیلم علت اصلی عفونت‌های بیمارستانی می‌باشد چرا که باکتری که به سطح متصل شده و به وسیله پلی ساکارید خارجی در برابر انواع مختلف آنتی‌بیوتیک‌ها و دیگر استرس‌های محیطی محافظت می‌شود و بیوفیلم پراکنش باکتری و بیماری‌زایی باکتری را افزایش می‌دهد. ازآنجایی‌که این باکتری‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف مقاوم می‌باشد امروزه از عصاره‌های گیاهی برای از

www.SID.ir

Archive Of SID

بین بردن آن‌ها استفاده می‌کنند که از آن جمله می‌توان به مرزه اشاره کرد (۶ و ۷).

مرزه با نام علمی Satureja hortensis، گیاهی یک ساله از خانواده نعناعیان، علفی و گاهی هم بوته‌ای و بومی مدیترانه شرقی و جنوب غرب آسیا است و اولین بار در ایتالیا کشت داده شده است. مرزه به‌صورت سنتی به‌عنوان گیاهی دارویی، به‌عنوان داروی محرک، ضدنفخ، خلط‌آور، مقوی معده و همچنین ضد اسهال و تقویت‌کننده قوای جنسی و ضدعفونت کاربرد دارد (۸ و ۹). مرزه حاوی فلاونوئیدهایی ازجمله کاراکرول، تیمول، δ ترپین، ρ سیمنی، آلفا و بتا پینین است (۱۰). کاراکرول مهم‌ترین ترکیب اسانس گونه‌های مرزه است که دارای خاصیت ضدعفونی‌کننده و ضدمیکروبی است (۱۱). در این مطالعه اثر ضدمیکروبی عصاره مرزه در تشکیل بیوفیلم در برخی پاتوژن‌های باکتریال مهم انسان مورد بررسی قرارگرفته است.

روش کار

تهیه نمونه: مرزه به‌صورت سنتی به‌عنوان گیاهی دارویی و ضد عفونت کاربرد دارد. برگ گیاه مرزه، از منطقه کرمان جمع‌آوری و توسط متخصصین گیاه‌شناس دانشگاه آزاد اسلامی کرمان تایید شد. سپس برگ‌ها در شرایط مناسب و در سایه خشک شدند.

تهیه عصاره: برای تهیه عصاره از روش ماسراسیون استفاده می‌شود. به این صورت که پس از خرد کردن برگ‌ها، ۵۰ گرم از هر نمونه این مدت زمان با کاغذ صافی صاف می‌گردد. بعد از اتمام عملیات عصاره گیری، عصاره‌های به دست آمده با استفاده از دستگاه روتاری (تقطیر در خلأ) در دمای ۴۰ تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد تغلیظ می‌شوند و در دمای ۵۰-۴۰ درجه به مدت ۲ روز خشک می‌شوند (۱۲ و ۱۳).

تعیین وزن خشک عصاره: ابتدا وزن یک لوله آزمایش تعیین و پس از آن ۱ میلی‌لیتر از عصاره‌ها در آن ریخته می‌شود و سپس محتوی لوله در دمای اتاق خشک می‌گردد. بعد از خشک شدن عصاره‌ها، وزن لوله آزمایش مجدداً تعیین می‌گردد. اختلاف وزن لوله معادل با وزن خشک عصاره‌ها محاسبه می‌شود (۱۴).

تهیه باکتری: باکتری‌های مورد استفاده عامل اصلی بیماری‌زایی در انسان (به‌ویژه عفونت‌های ادراری) و تشکیل بیوفیلم است که عبارتند از باکتری‌های استرپتوکوکوس پیوژنز (ATCC®19615™)، استرپتوکوکوس پنومونیه (ATCC® 49619™)، استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس (ATCC® 15305™)، پروتئوس میرابیلیس (ATCC® 35659™)، استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC® 25923™) می‌باشد که از مرکز آرین مهر تهران به‌صورت ویال لیوفیلیزه تهیه شد. سوسپانسیون حاصل به محیط کشت استریل بلاد آگار، نوترینت براث در پلیت اضافه شده و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

تعیین حساسیت باکتری به آنتی‌بیوتیک‌های مرسوم: باکتری‌های فریز شده را ساب کالچر می‌دهیم و بعد از انکوباسیون از باکتری سوسپانسیونی با کدورت یکسان با ۰/۵ واحد مک فارلند تهیه می‌کنیم، سپس سوسپانسیون حاصل را یک به ۱۰ رقیق می‌کنیم.

از رقت حاصل ۰/۱ میلی‌لیتر برداشته و بر روی محیط کشت مناسب بر اساس نوع باکتری به‌صورت سفره‌ای کشت می‌دهیم. سپس دیسک‌های حاوی آنتی‌بیوتیک را روی محیط‌های کشت قرار می‌دهیم. بعد از انکوباسیون با استفاده از جدول آنتی‌بیوگرام و اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد، مقاوم حساس یا نیمه حساس بودن باکتری به آنتی‌بیوتیک‌های مرسوم مشخص می‌گردد.

آزمون ضدمیکروبی عصاره: حساسیت جدایه‌های باکتری نسبت به عصاره‌های گیاهی با استفاده از روش رقت سازی در چاهک بررسی می‌شود. به هفت چاهک از پلیت‌های میکروتیتر میزان ۱۰۰ میکرولیتر از محیط مایع مغذی مولر هینتون (MHB) اضافه می‌شود. به چاهک اول ۱۰۰ میلی‌لیتر از محلول رقیق شده عصاره اضافه می‌شود و پس از مخلوط کردن ۱۰۰ میکرولیتر از چاهک اول برداشته به چاهک دوم اضافه می‌گردد و بدین ترتیب تا آخرین چاهک این کار انجام داده

www.SID.ir

Archive Of SID

می‌شود. از چاهک آخر ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت خارج می‌گردد. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی حاوی 10^7 واحد در میلی‌لیتر معادل ۰/۵ مک فارلند اضافه می‌شود و در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده می‌شود. اولین چاهکی که از رشد باکتری پس از قرار دادن در انکوباتور جلوگیری کرده باشد به‌عنوان (Minimum -MIC inhibitory concentration) در نظر گرفته شده و برای اطمینان از چاهک‌های شفاف ۱۰ میکرولیتر برداشته و به محیط مولر هینتون آگار منتقل می‌گردد و پس از ۲۴ ساعت اولین رقتی که توانسته ۹۹/۹ درصد باکتری را از بین ببرد به‌عنوان حداقل غلظت کشنده نشان داده می‌شود (۱۵).

تشکیل بیوفیلم: در بررسی اثر عصاره گیاهی مرزه بر تشکیل بیوفیلم باکتری‌ها نیز از روش رقت سازی در چاهک استفاده شده است. به هفت چاهک از پلیت‌های میکروتیتر میزان ۱۰۰ میکرولیتر از محیط مایع مغذی نوترینت براث و TSB اضافه شد. به چاهک اول ۱۰۰ میلی‌لیتر از محلول رقیق شده عصاره (۱۰ میلی‌گرم از عصاره در یک سی‌سی از حلال (DMSO) دی متیل سولفید اکسید حل شده است) اضافه شده و پس از مخلوط کردن ۱۰۰ میکرولیتر از چاهک اول برداشته به چاهک دوم اضافه گردید و بدین ترتیب تا آخرین چاهک این کار انجام داده شده است (به جز چاهک شاهد) از چاهک آخر ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت خارج گردید. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی به تمام چاهک‌ها اضافه کرده و پس از پوشاندن توسط نایلون سلوفان (پارافیلم) در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. بعد از گذشت این زمان محتوای چاهک‌ها را خارج کرده و سرم فیزیولوژی استریل اضافه نموده و میکروپلیت به آرامی تکان داده تا سلول‌ها با اتصال ضعیف یا آزاد جدا شوند. مجدد محتوای چاهک‌ها خارج شده و ۳۰۰ میکرولیتر الکل ۹۶ درصد به مدت ۱۵ دقیقه به چاهک‌ها اضافه نموده تا سلول‌ها فیکس شوند. پس از خارج نمودن الکل، چاهک‌ها توسط کریستال ویوله‌ی ۲ درصد به مدت ۵ دقیقه رنگ‌آمیزی شده و بعد از گذشت این زمان چاهک‌ها را شسته شده و اسید استیک ۳۳ درصد به آن‌ها اضافه و در دستگاه الایزا ریدر که روی طول موج ۴۹۲ نانومتر تنظیم شده قرار می‌دهیم (۱۵).

یافته‌ها

نتایج حاصل از تعیین حساسیت باکتری ها به آنتی‌بیوتیک‌ها نشان داد که باکتری استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های اریترومایسین، سفکسیم، تتراسایکلین مقاومت نشان داده است. بعد از دیسک گذاری هاله عدم رشد تشکیل نشده یا قطر هاله‌ی تشکیل شده بسیار کوچک بوده (براساس رفرنس CLSI). باکتری استرپتوکوکوس پیوژنز نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها حساس بوده (هاله عدم رشد تشکیل شده است) و استرپتوکوکوس پنومونیه نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های اریترومایسین، سفکسیم، سفتازیدیم مقاومت نشان داده. همچنین باکتری استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های اریترومایسین، سفتازیدیم، تتراسایکلین مقاوم بوده و باکتری پروتئوس میرابیلیس به آنتی‌بیوتیک‌های اریترومایسین،

جدول ۱- نتایج حداقل غلظت مهار کننده و الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی عصاره گیاه مرزه در برابر پاتوژن‌های انسانی

باکتری	حداقل غلظت مهار کنندگی مرزه (ppm)	الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی
استافیلوکوکوس اورئوس	۵۰	E,CE,TE
استرپتوکوکوس پیوژنز	۲۵	-
استرپتوکوکوس پنومونیه	۲۵	E,CE,CF
استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس	۲۵	E,CF,TE
پروتئوس میرابیلیس	۱۲/۵	E,TE

E= اریترومایسین CE= سفکسیم CF=سفتازیدیم TE= تتراسیکلین

www.SID.ir

Archive Of SID

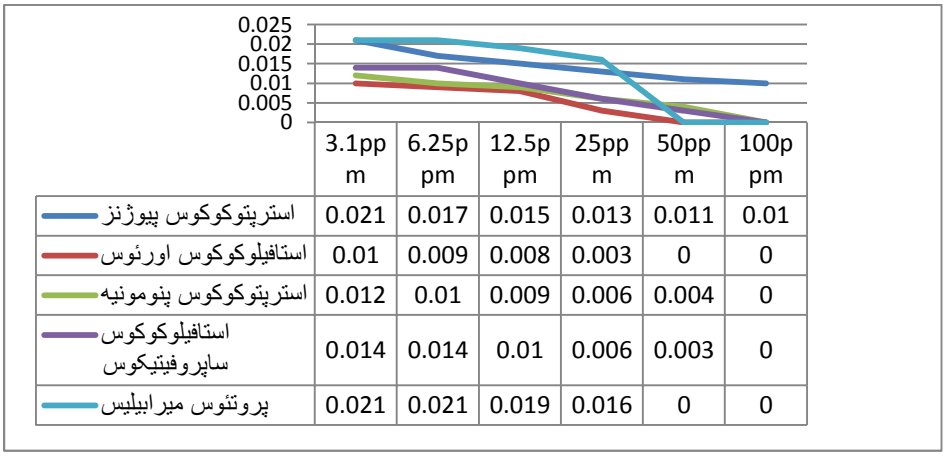
جدول ۲- الگوی شدت بازدارندگی عصاره مرزه در برابر پاتوژنهای انسانی در غلظت های مختلف

باکتری	۳/۱ ppm	۶/۲۵ ppm	۱۲/۵ ppm	۲۵ppm	۵۰ppm	۱۰۰ppm
استرپتوکوکوس پیوژنز	++	++	++	+	–	–
استافیلوکوکوس اورئوس	++	++	++	++	+	–
استرپتوکوکوس پنومونیه	++	++	++	+	–	–
استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس	++	++	++	+	–	–
پروتئوس میرابیلیس	++	++	+	–	–	–

++ نشان دهنده رشد زیاد میکرواورگانیسم ها

+ نشان دهنده رشد کم میکرواورگانیسم

– نشان دهنده عدم رشد میکرواورگانیسم



	3.1ppm	6.25ppm	12.5ppm	25ppm	50ppm	100ppm
استرپتوکوکوس پیوژنز	0.021	0.017	0.015	0.013	0.011	0.01
استافیلوکوکوس اورئوس	0.01	0.009	0.008	0.003	0	0
استرپتوکوکوس پنومونیه	0.012	0.01	0.009	0.006	0.004	0
استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس	0.014	0.014	0.01	0.006	0.003	0
پروتئوس میرابیلیس	0.021	0.021	0.019	0.016	0	0

شکل ۱- میزان جذب (OD) تشکیل بیوفیلم در عصاره گیاه مرزه با استفاده از دستگاه الایزا

تتراسایکلین مقاومت نشان داده است. نتایج حاصل از بررسی اثرات ضدمیکروبی عصاره مرزه نشان داد که کمترین غلظت مهارکنندگی ۱۲/۵ppm در برابر باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و پروتئوس میرابیلیس مشاهده شد که یک باکتری گرم منفی بوده است درحالی‌که بیشترین غلظت مهارکننده در برابر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس مشاهده شد که غلظت ۵۰ppm بوده است (جدول ۱) که میزان رشد کم، زیاد و عدم رشد ابتدا به‌صورت چشمی خوانده می‌شود و سپس برای اطمینان از چاهک‌ها کشت تهیه می‌شود.

نتایج حاصل از بررسی عصاره رزماری نیز در برابر پاتوژن‌های انسانی نشان داد که کمترین غلظت مهارکنندگی عصاره رزماری غلظت ۳/۱ppm بود که در برابر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس مشاهده شد، درحالی‌که بیش‌ترین غلظت مهارکنندگی ۱۲/۵ppm بود که باکتری‌های استرپتوکوکوس پیوژنز، استرپتوکوکوس پنومونیه و استافیلوکوکوس ساپروفتیکوس را مهار کرده است (جدول ۱). همچنین شدت بازدارندگی (زیاد، کم و عدم رشد) عصاره مرزه در برابر پاتوژن‌های باکتریال مهم انسانی در غلظت‌های مختلف ثبت گردید (جدول ۲).

نتایج حاصل از بررسی اثر عصاره مرزه بر روی تشکیل بیوفیلم پاتوژن‌های انسانی نشان داد که عصاره گیاه مرزه در غلظت ۱۰۰ppm به‌طور کامل مانع تشکیل بیوفیلم باکتری‌های استرپتوکوکوس پنومونیه و استافیلوکوکوس ساپروفتیکوس شده است و همچنین در غلظت‌های ۱۰۰ppm و ppm50تشکیل بیوفیلم باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و پروتئوس میرابیلیس صفر بوده درصورتی‌که میزان تشکیل بیوفیلم باکتری استرپتوکوکوس پیوژنز با افزایش غلظت به تدریج کم اما به‌طور کامل مهار نشده است (شکل ۱).

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج در این مطالعه نشان داد که کمترین

www.SID.ir

Archive Of SID

غلظت مهارکنندگی عصاره گیاه مرزه در برابر باکتری‌های مورد مطالعه غلظت ۱۲/۵ppm بوده است که در برابر باکتری پروتئوس میرابیلیس مشاهده شده است که یک باکتری گرم منفی بوده است درحالی‌که بیشترین غلظت مهارکنندگی در برابر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس مشاهده شده که غلظت ۵۰ppm بوده است که احتمالاً به علت وجود دیواره ضخیمی که در باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس مشاهده می‌شود عصاره با غلظت بالاتری آن را مهار کرده است.

آزاز و همکاران در سال ۲۰۰۲ برای تعیین میزان فعالیت ضد باکتریایی اسانس ۳ گونه از مرزه به نام‌های S.coeralen،S.pilosa و S.boissieri بر باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، سودوموناس آئروژینوازا، اشریشیاکلی و سالمونلا تیفی موریوم از روش میکرودیلیشن استفاده کردند، نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که میزان کمترین غلظت مهارکنندگی این ۳ گونه مرزه برای سودوموناس آئروژینوزا و اشریشیاکلی ۱۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و برای استافیلوکوکوس اورئوس و سالمونلا تیفی موریوم در محدوده ۱۲۵-۶۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر می‌باشد (۱۶). محبوبی و کاظم پور در سال ۲۰۱۱ در تحقیقی به بررسی اسانس Satureja hortensis پرداختند. در این بررسی با روش مایکرودایلوشن براث فعالیت این گونه از مرزه علیه باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، سودوموناس آئروژینوزا، اشریشیاکلی و سالمونلا تیفی موریوم ارزیابی شد. دراین مطالعه سودوموناس آئروژینوزا به اسانس مرزه مقاومت بیشتری نشان داد، در حالی که استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیا کلی نسبت به آن حساس تر بودند، به‌طوری که میزان MIC برای استافیلوکوکوس اورئوس ۲ میلی‌لیتر بر میلی‌لیتر اشریشیا کلی و سالمونلا تیفی موریوم ۱ میلی‌لیتر بر میلی‌لیتر و سودوموناس آئروژینوزا ۸ میلی‌لیتر بر میلی‌لیتر بود (۱۷). در مطالعات تیموری نتایج نشان داد که غلظت مهارکنندگی (MIC) اسانس گیاهی مرزه برای باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، میکروکوکوس لوتئوس، باسیلوس سرئوس، باسیلوس سوبتلیس، پسودوموناس آئروجنوزا، کلبسیلا أکسیتوکا، کلبسیلاپنومونیه، به ترتیب ۲۵۰،۲۵۰، ۱۵۰۰< ۲۵۰،۲۵۰، ۱۲۵ و ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر است (۱۸). در مطالعات اوزکالپ نتایج نشان داد اسانس مرزه با غلظت‌های ۷۰، ۸۰، ۹۰ و ۱۰۰ میکروگرم بیش‌ترین اثر مهارکنندگی را بر روی باکتری‌های استرپتوکوکوس پنومونیه، سالمونلا انتریدیس، کلبسیلا پنومونیه، اشرشیا کولی، پسودوموناس آئروجنوزا و استرپتوکوکوس موتانس دارد (۱۹). مطالعات میهاجیلاو-کرستیو و همکاران نشان داد که حجم MIC (حداقل غلظت مهارکنندگی) و MBC (حداقل غلظت کشندگی) اسانس مرزه ۲۵-۰/۷۸ میکرولیتر بر میلی‌لیتر در برابر باکتری‌های کلبسیلا، اشرشیا، پروتئوس، استافیلوکوکوس، استرپتوکوکوس، انتروکوکوس، انتروباکتر، سیتروباکتر و اسینتو باکتر می‌باشد (۲۰)؛ و نتایج اسانس مرزه با غلظت‌های مختلف هاله مهاری به ترتیب زیر در برابر باکتری‌های باسیلوس سوبتیلیس (۱۸-۲۳-۴۵ میلی متر)، سارسینا لوته آ (۱۹-۲۳-۳۸ میلی متر)، میکروکوکوس فلاووس (۱۷-۲۲-۲۳ میلی متر) و استافیلوکوکوس اورئوس (۱۸-۲۰-۳۰ میلی متر) ایجاد کرده است (۲۱). در مطالعه کرمی- اسبو قطر هاله مهاری اسانس مرزه در برابر اروینیا امیلوورا، ۲۵ میلی متر بوده است (۲۲). نتایج گالوک و همکاران نشان داد که قطر هاله مهاری اسانس مرزه در برابر باکتری‌های باسیلوس سوبتیلیس، اشریشیا کولی، کلبسیلا پنومونیه، پروتئوس ولگاریس، استافیلوکوکوس اورئوس و استرپتوکوکوس پنومونیه به ترتیب ۲۱، ۱۸، ۲۳، ۱۸، ۲۲ و ۲۱ میلی متر بوده است (۲۳).

همان گونه که ذکر شد در میزان MIC گزارش شده توسط محققین مختلف با هم و با تحقیق حاضر تفاوت مشاهده می‌شود. یکی از دلایل اصلی آن این است که درصد ترکیبات مختلف و ازجمله مواد با خاصیت ضد میکروبی موجود در اسانس و عصاره گیاهان بسته به ناحیه جغرافیایی، واریته گیاه، سن گیاه، روش خشک کردن گیاه و روش اسانس و یا عصاره گیری تفاوت های چشمگیری دارد (۲۴). در همین راستا کاوار و همکاران در

www.SID.ir

Archive Of SID

سال ۲۰۰۸ اشاره کردند که فاکتورهایی همچون موقعیت جغرافیایی، دما و طول روز در میزان ترکیبات اسانس مرزه نقش کلیدی دارند (۲۵). یکی دیگر از دلایل اختلاف در MIC و MBC اندازه گیری شده در تحقیق حاضر و مطالعات گذشته به این دلیل است که در بررسی حاضر خاصیت ضد باکتریایی عصاره الکلی مرزه بختیاری مورد ارزیابی قرار گرفته است، درحالی که در بررسی های گذشته به ارزیابی این خاصیت در اسانس گونه های مختلف مرزه پرداخته شده است. همچنین در تحقیقات گذشته بیشتر به ارزیابی این خاصیت در گونه هایی غیر از مرزه بختیاری پرداخته اند.

نتایج حاصل از بررسی اثر عصاره مرزه بر روی تشکیل بیوفیلم پاتوژن‌های انسانی نشان داده است که عصاره گیاه در غلظت ppm۱۰۰ به‌طور کامل مانع تشکیل بیوفیلم باکتری‌های استرپتوکوکوس پنومونی و استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس شده است و همچنین بیوفیلم باکتری استرپتوکوکوس پیوژنز در غلظت‌های مختلف از عصاره تشکیل شده است اما به میزان کم مشاهده شده است. تشکیل بیوفیلم سبب می‌شود که باکتری‌ها به عوامل ضدمیکروبی مقاوم شوند. اولین مرحله تشکیل بیوفیلم اتصال سلول‌های باکتری به سطوح می‌باشد که عوامل زیادی ازجمله حرکت باکتری‌ها، هیدروفوبیسیتی سطح آنها، جنس سطح مورد اتصال در آن نقش دارد. مطالعات آدونیزو نشان دادند که عصاره‌های گیاهان کنوکارپوس ارکتوس، بوسیدا بوکراس و کالیستمون ویمینالیس مهارکننده تشکیل بیوفیلم پسودوموناس آئروژینوزا از طریق تداخل در پدیده کوروم سنسینگ می‌باشند (۲۶). در مطالعه آگاروال، عصاره‌های برگ گیاهان زرد چوبه، چای، برگ تنبول و نعناع فلفلی مهارکننده تشکیل بیوفیلم اشرشیاکلی می‌باشند (۲۷).

درمان بیوفیلم هنوز یکی از معضلات مهم بشر بوده و نیاز به مطالعه بیشتری دارد. به‌طور کلی از بین بردن بیوفیلم ها پس از تشکیل سخت و طاقت فرسا است و بهتر است از تشکیل بیوفیلم جلوگیری شود. از طرف دیگر کاهش تشکیل بیوفیلم در حضور غلظت‌های مختلف عصاره گیاه نسبت به شاهد مبین به این مطلب است که بیوساید مصرفی سبب کاهش تشکیل بیوفیلم می‌شود؛ بنابراین در مجموع، اثرات عصاره‌های گیاهان بر ممانعت از تشکیل بیوفیلم را می‌توان مربوط به اثرات بخش‌های تشکیل دهنده بر رشد باکتری‌ها و در نهایت کاهش تشکیل بیوفیلم باکتری‌ها دانست.

بنابراین مطالعات بیشتری لازم است تا با توجه به ترکیبات متنوع و زیاد در اسانس و عصاره گیاهان دارویی و مقایسه گیاهان مختلف از نظر ترکیبات متشکله آن ها در مناطق بومی و معرفی نژادهای برترمورد بررسی قرار گیرد.

تقدیر و تشکر

ازکلیه کسانی که به سرانجام رساندن این تحقیق همراهی نموده اند و باکرامتی چون خورشید، سرزمین دل را روشنی بخشیدند وگلشن سرای علم ودانش رابا راهنمایی های کارساز وسازنده بارورساختند، صمیمانه وصادقانه سپاسگزاریم.

منابع

1. Gubner R, Beech I. The effect of extracellular polymeric substances on the attachment of Pseudomonas NCIMB 2021 to AISI 304 and 316 stainless steel. Biofouling. 2000;15(1-3): 25-36.

2. Bos R, Van der Mei HC, Busscher HJ. Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions–its mechanisms and methods for study. FEMS. 1999;23(2): 179-230.

3. Baty AM, Suci PA, Tyler BJ, Geesey GG. Investigation of mussel adhesive protein adsorption on polystyrene and poly (octadecyl methacrylate) using angle dependent XPS, ATR-FTIR, and AFM. colloid and interface science. 1996;177(2): 307-15.

4. Davey ME, O'toole GA. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. MMBR. 2000;64(4): 847- 67.

5. Svensäter G, Larsson UB, Greif E, Cvitkovitch D, Hamilton I. Acid tolerance response and survival by oral bacteria. ORAL MICROBIOL IMMUN. 1997;12(5):266-73.

6. Kojic EM, Darouiche RO. Candida infections of medical devices. CMR 2004;(2): 255- 67.

7. Peterson TS. Treatment and prevention of fungal infection. Focus on candidemia. New York: applied clinical education. 2007.

8. Sefidkon F, Jamzad Z, Barazandeh M. Essential oil of Satureja bachtiarica Bunge, A

www.SID.ir

Archive Of SID

potential source of carvacrol. Ijmapr. 2005; 20(4): 425-39.

9. Emami A, Shams Ardakani MR, Mehregan I. Encyclopedia of Medicinal Plants. Traditional Medicine & Materia Medica Research Center (TMRC), Shaheed Beheshti University of Medical Sciences; 2004.p.449.

10. Omidbeygi M, Barzegar M, Hamidi Z, Naghdibadi H. Antifungal activity of thyme, summer savory and clove essential oils against Aspergillus flavus in liquid medium and tomato paste. Food control. 2007;18(12): 1518-23.

11. Abbasi K.H, Sefidkon F, Yamini Y. [Comparison of oil content and composition of two Satureja species (Satureja hortensis L. & Satureja rechingeri Jamzad) by hydrodistillation and supercritical fluid extraction (SFE)]. Ijmapr. 2005;21(3):307-18. Persian.

12. Manna A, Abalaka ME. Preliminary screening of the various extracts of Physalis angulata (L.) for antimicrobial activities. Spectrum J. 2000;7(2):119-25.

13. Shariff ZU. Modern herbal therapy for common ailments. Nature pharmacy series. Spectrum Books limited. United Kingdom; 2001. p. 9-84.

14. Sattari M, Shahbazi N, Pirayeh SN. [Evaluation of antibacterial effect of aqueous and alcoholic extract of eucalyptus on Pseudomonas aeruginosa]. Madars Medical. 2005;8(1): 19-33. Persian.

15. Wikler MA, editor. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Seventeenth informational supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007.

16. Azaz D, Demirci F, Satıl F, Kürkçüoğlu M, Hüsnü K, Başerb C. Antimicrobial activity of some Satureja essential oils. Zeitschrift für Naturforschung C. 2002 Oct 1;57(9-10):817-21.

17. Mahboubi M, Kazempour N. [Chemical composition and antimicrobial activity of Satureja hortensis and Trachyspermum copticum essential oil]. IJM. 2011;3(4):194-200. Persian.

18. Teimori M. [Essential oil analysis and antibacterial activity of Satureja bachtiarcia bunge in Ardebil province]. Irainian Plant Ecophysiological. 2009; 4(2):19-26. Persian.

19. Özkalp B, Özcan MM. Antibacterial activity of several concentrations of sater (Satureja hortensis L.) essential oil on spoilage and pathogenic food-related microorganisms. WASJ. 2009;6(4):509-14.

20. Mihajilov-Krstev T, Radnovic D, Kitic D, Stojanovic-Radic Z, Zlatkovic B. Antimicrobial activity of Satureja hortensis L. essential oil against pathogenic microbial strains. BIO. 2009; 23(4):1492-6.

21. Mihajilov-Krstev T, Radnović D, Kitić D, Stojanović-Radić Z, Zlatković B. Antimicrobial activity of Satureja hortensis L. essential oil against pathogenic microbial strains. IMGGE. 2010; 62(1):159-66.

22. Karami-Osboo R, Khodaverdi M, Ali-Akbari F. Antibacterial effect of effective compounds of Satureja hortensis and Thymus vulgaris essential oils against Erwinia amylovora. JAST. 2010;12:35-45.

23. Güllüce M, Sökmen M, Daferera D, Agar G, Özkan H, Kartal N, et al. In vitro antibacterial, antifungal, and antioxidant activities of the essential oil and methanol extracts of herbal parts and callus cultures of Satureja hortensis L. ASAP. 2003;51(14):3958-65.

24. Jerković I, Mastelić J, Miloš M. The impact of both the season of collection and drying on the volatile constituents of Origanum vulgare L. ssp. hirtum grown wild in Croatia. ASAP. 2001;36(6):649-54.

25. Ćavar S, Maksimović M, Šolić ME, Jerković-Mujkić A, Bešta R. Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of two Satureja essential oils. FOOD CHEM. 2008;111(3): 648-53.

26. Adonizio AL. Anti-quorum sensing agents from South Florida medicinal plants and their attenuation of Pseudomonas aeruginosa pathogenicity. FIU Electronic Theses and Dissertations; 2008.

27. Agarwal R, Singh S, Bhilegaonkar K, Singh V. Optimization of microtitre plate assay for the testing of biofilm formation ability in different Salmonella serotypes. IFRJ. 2011;18(4): 1493-8.

www.SID.ir

Archive Of SID

Original Article http://rjms.iums.ac.ir

Antimicrobial effect of extracts of Satureja hortensis biofilm on some important human bacterial pathogens

***Asma Teymuri**, MSc. in Microbiology, Department of Microbiology, Islamic Azad University Kerman, Kerman, Iran (*Corresponding author). teymuri.as@gmail.com
Mohammad Bokaeian, PhD, Department of Microbiology, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran. bokaeian.m@gmail.com
Seyed Amin Papoli Baravati, MA in Physical Education and Sports Physiology, Azad University Kerman, Kerman, Iran. s.a.papoli@gmail.com

Abstract

Background: Today with increasing use of antibiotics and prevalence of resistant strains, there is need for antimicrobial drugs that have fewer side effects than the present antibiotics. Satureja hortensis is a medicinal plant which has many uses in traditional medicine. In this study, antimicrobial effect of extracts Satureja hortensis biofilm on some important human bacterial pathogens was studied.

Methods: In this in vitro study Satureja hortensis was used to evaluate its antimicrobial effects. Extract Satureja hortensis with concentrations of 50, 25 and 12/5 ppm were prepared and antibacterial activities were evaluated by well diffusion method on strains of *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Pneumococcus*, *Staphylococcus saprophyticus* and *Proteus mirabilis*. Minimum inhibitory concentration and maximum inhibitory concentration test was determined by microtitre plate. Satureja hortensis extracts were also prepared by Maceration method.

Results: The levels of MIC ranged from 12.5 to 50ppm. The highest MIC value observed against Staphylococcus aureus and lowest MIC value of Satureja extract concentration in 12.5ppm that against *P. mirabilis*. In addition, the results of this study showed that the rate of absorption (OD) for biofilm formation of *Staphylococcus aureus* in concentrations 50ppm Satureja extract was zero value.

Conclusion: Results of this study suggest that the extract of Satureja hortensis can be useful in treatment of bacterial infections.

Keywords: Biofilm, Antimicrobial activity, Satureja extract, Human pathogen

www.SID.ir