Archive of SID

Arak Medical University Journal (AMUJ)
2017; 19(116): 26-38

Original Article

Evaluation of Anti-Bacterial Activity and Biofilm Inhibition of *Satureja Khuzestanica Jamzad* against *Streptococcus Mutans*

Saeed Taebi[1*], Mokhtar Nosrati[2]

1-MSc of Microbial Biotechnology, Department of Biotechnology, Faculty of Advanced Sciences and Technologies, University of Isfahan, Isfahan, Iran
2-PhD of Nanobiotechnology, Department of Biotechnology, Faculty of Advanced Sciences and Technologies, University of Isfahan, Isfahan, Iran

Received: 13 Aug 2016, Accepted: 26 Oct 2016

Abstract

Background: In the recent years, introducing plant materials with the ability to destroy or control of biofilm formation of *Streptococcus mutans* is highly regarded.This study was planned to investigate the anti-bacterial activity and biofilm inhibition of *Satureja Khuzestanica Jamzad* against biofilm and single form of *S.mutans*.

Materials and Methods: The plant material collected, air dried and powdred. Then thier methanolic extract prepared by maceration method.The concentrated extract then diluted by *sterile phosphate buffer*.The anti-bacterial and biofilm inhibition activity of the extracts evaluated by dick diffiusion and micro titeration method respectively. Also, bioinformatic study of glucansucrase inhibition by dominant plant compounds of *S.Khuzestanica Jamzad* investigated by molecular docking method using Auto dock4 software.

Results: The results revalued that all tested extracts especially leaf ectract had significant antibacterial activity against single form of *S.mutans.*Results also showed that leaf and stem extract had most and least biofilm inhibition with 70 and 13 presend inhibition, respectively. The bioinformatics results also confirmed that studied phytochemicals especially gama-terpinen, carvacrol and *beta-bisabolene* can effectively inhibit the glucansucrase.

Conclusion: The results of present study showed that *S.Khuzestanica Jamzad* had significant antibacterial activity against single form of *S.mutans* and gama-terpinen, carvacrol and *beta-bisabolene* are most effective compounds in biofilm inhibition.

Keywords: Biofilm, Glucansucrase enzyme, *Satureja Khuzestanica Jamzad, Streptococcus mutans*,

*Corresponding Author:
Address: Department of Biotechnology, Faculty of Advanced Sciences and Technologies, University of Isfahan, Isfahan, Iran
Email: taebi.saeed@gmail.com

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 9:50 +0430 on Tuesday May 30th 2017

www.SID.ir

Archive of SID

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال ۱۹، شماره ۱۱ (شماره پیاپی ۱۱۶)، بهمن ۱۳۹۵، ۳۸-۲۶

بررسی قابلیت ضد باکتریایی و ضد بیوفیلمی مرزه خوزستانی در برابر استرپتوکوکوس موتانس

سعید تائبی[1]*، مختار نصرتی[2]

۱.کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی میکروبی، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فن‌آوری‌های نوین، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
۲.دکتری تخصصی نانوبیوتکنولوژی، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فن‌آوری‌های نوین، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

تاریخ دریافت: ۹۵/۰۵/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۸/۰۵

چکیده

زمینه و هدف: معرفی ترکیبات گیاهی با قابلیت حذف یا کنترل تشکیل بیوفیلم‌های استرپتوکوکوس موتانس در سال‌های اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته است. هدف از مطالعه‌ی حاضر، بررسی قابلیت ضدباکتریایی و مهار تشکیل فرم بیوفیلمی استرپتوکوکوس موتانس به وسیله‌ی عصاره‌ی متانولی مرزه‌ی خوزستانی است.

مواد و روش‌ها: نمونه‌های گیاهی پس از جمع‌آوری و شست‌وشو در سایه خشک و سپس آسیاب شدند. عصاره‌ی متانولی بخش‌های مختلف با روش غوطه‌وری در متانول تهیه شد، سپس با استفاده از بافر فسفات استریل رقیق گردید. قابلیت ضد باکتریایی و مهارکنندگی فرم بیوفیلمی با استفاده از روش انتشار دیسک و میکروتیتراسیون ارزیابی شد. بررسی بیوانفورماتیکی قابلیت مهار کنندگی آنزیم گلوکان سوکراز توسط ترکیبات غالب گیاهی با استفاده از روش داکینگ مولکولی در نرم‌افزار Auto dock4 صورت گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که عصاره‌ی گیاه مذکور به ویژه عصاره‌ی برگ از قابلیت ضد باکتریایی بالایی در برابر فرم منفرد استرپتوکوکوس موتانس برخوردار می‌باشد. نتایج هم‌چنین نشان داد که عصاره‌ی برگ و ساقه به ترتیب با ۷۰ و ۱۳ درصد بیش‌ترین و کم‌ترین اثربخشی را در مهار تشکیل ساختار بیوفیلمی داشتند. نتایج بررسی بیوانفورماتیکی نیز نشان داد که ترکیبات گیاهی مورد بررسی به ویژه گاماترپینن، کارواکرول و بتا-بیسابولن به طور موثر می‌توانند گلوکان سوکراز را مهار نمایند.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که مرزه خوزستانی قابلیت ضد باکتریایی بالایی در برابر فرم منفرد استرپتوکوکوس موتانس داشته و گاماترپینن، کارواکرول و فامسن ترکیبات موثر این گیاه در ظهور قابلیت مهار تشکیل بیوفیلم باکتری مذکور می‌باشند.

واژگان کلیدی:استرپتوکوکوس موتانس، آنزیم گلوکان سوکراز، بیوفیلم ، مرزه خوزستانی

***نویسنده مسئول:** ایران، اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم و فن‌آوری‌های نوین، گروه بیوتکنولوژی

Email: taebi.saeed@gmail.com

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 9:50 +0430 on Tuesday May 30th 2017

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 9:50 +0430 on Tuesday May 30th 2017

مقدمه

پوسیدگی دندان یکی از مهم‌ترین معضلات پیش روی سلامت عمومی در جوامع مختلف به ویژه کشورهای توسعه نیافته و درعین حال جزو بیماری‌های شایع در کشورهای توسعه یافته نیز می‌باشد. این بیماری عارضه‌ای چند عاملی و مهم است که بخش عظیمی از پژوهش‌های حوزه‌ی سلامت عمومی به ویژه تحقیقات میکروب شناسی را به خود اختصاص می‌دهد. با وجود اثر گذاری عوامل مختلف در ایجاد و پیشرفت پوسیدگی دندان اما فعالیت باکتری‌های تولید کننده‌ی اسید به ویژه بیوفیلم‌های استرپتوکوکوس موتانس اصلی‌ترین عامل ایجاد کننده‌ی این عارضه محسوب می‌شود(۱، ۲).

استرپتوکوکوس موتانس باکتری کروی شکل، گرم مثبت، بی هوازی اختیاری، فاقد قدرت حرکت و دارای قابلیت متابولیزه کردن قندهای مختلف به ویژه سوکروز می‌باشد. این باکتری با متابولیزه کردن قندهای موجود در محیط اطرافش اسید تولید نموده که در نهایت موجب حل شدن مینای دندان‌ها و ظهور حالت پوسیده‌ی آن‌ها می‌شود(۳). ایجاد بیوفیلم‌های باکتری مذکور منوط به حضور آنزیمی ویژه به نام گلوکان سوکراز یا گلوکوزیل ترانسفراز است. آنزیم مذکور عضوی از خانواده آنزیمی گلیکوزید هیدرولازها موسوم به GH70 می‌باشد. این آنزیم دارای تعداد اسید آمینه‌های مختلفی در سویه‌های مختلف می‌باشد اما به طور میانگین دارای ۱۷۰۰-۱۱۰۰ اسید آمینه بوده و توسط ژن gft کد می‌شود. بررسی‌های کریستالوگرافی انجام شده در خصوص تعیین ساختار آنزیم گلوکان سوکراز استرپتوکوکوس موتانس حاکی از ساماندهی اسید آمینه‌های این آنزیم در هشت زنجیره‌ی پلی پپتیدی A- H می‌باشد(۴، ۵). تعدادی از اسید آمینه‌های این آنزیم شامل: Tyr430, Asn481,Ser589,Asp909 وTyr916 در خانواده‌ی آنزیمی GH70 به صورت حفاظت شده بوده لذا طراحی دارو مبتنی بر مهار و بر همکنش با این اسیدآمینه‌ها هدف بسیاری از پژوهش‌های دارویی قرار گرفته است(۶). گلوکان سوکراز با اتصال واحدهای گلوکز از طریق پیوندهای مختلف از نوع آلفا موجب سنتز یک هموپلیمر ویژه موسوم به گلوکان می‌شود. ترشح این هموپلی ساکارید چسبناک توسط استرپتوکوکوس موتانس موجب شکل‌گیری بیوفیلم‌های این باکتری و اتصال محکم آن‌ها به سطح دندان می‌شود. استرپتوکوکوس موتانس به طور معمول دارای سه نوع آنزیم گلوکان سوکراز است که GTFB،GTFC و GTFD نامیده می‌شوند. این آنزیم‌ها توسط ژن‌هایی با همین نام کد شده که نوع B و D به ترتیب با اتصال واحدهای قندی از طریق پیوندهای آلفا(۳-۱) و آلفا(۶-۱) انواع محلول و غیر محلول هموپلی ساکارید گلوکان را سنتز می‌کنند اما نوع C آنزیم گلوکان سوکراز هر دو نوع محلول و غیر محلول گلوکان را سنتز می‌کند(۷، ۸).

نقش کلیدی آنزیم گلوکان سوکراز در ایجاد پوسیدگی دندان موجب شده تا پژوهش‌های زیادی طی سال‌های اخیر با هدف جستجو و معرفی ترکیبات مهار کننده‌ی این آنزیم خصوصا ترکیباتی با منشا طبیعی به ویژه ترکیبات گیاهی انجام شود. نتیجه بررسی‌های مختلف صورت گرفته در این خصوص خواص ضد باکتریایی چندین گیاه دارویی از جمله میخک، آویشن،کلپوره، زعفران ، مریم گلی را بر استرپتوکوکوس موتانس تایید نموده است اما با این وجود تا کنون ترکیب دارویی موثری که بتواند به صورت کامل و موثر آنزیم مذکور را مهار کند معرفی نشده لذا بررسی‌ها جهت دستیابی به ترکیب دارویی موثر هم چنان ادامه دارد(۹-۱۳).

یکی از رهیافت‌های نوین معرفی ترکیبات دارویی جدید استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی مختلف است. در این راستا تاکنون روش‌ها و ابزارهای مختلف بیوانفورماتیکی با هدف شبیه سازی برهمکنش بین مولکول‌ها، تعیین دومین‌های فعال آنزیمی، تعیین اسید آمینه‌های کلیدی در فعالیت آنزیمی، غربالگری مولکول‌های دارویی براساس ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و پیش بینی سمیت ترکیبات شیمیایی مختلف معرفی شده‌اند که بر اساس آن‌ها می‌توان با ضریب دقت بالایی خواص دارویی، مکانیسم اثر و

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 9:50 +0430 on Tuesday May 30th 2017

سمیت‌های احتمالی ترکیبات مختلف را قبل از انجام کارآزمایی‌های آزمایشگاهی و بالینی پیش بینی نمود(۱۴).

مرزه خوزستانی با نام علمی *Satureja Khuzestanica Jamzad* متعلق به تیره‌ی نعناعیان و یکی از گیاهان دارویی بومی ایران می‌باشد. بررسی‌های مختلف انجام شده در خصوص اثرات مطلوب دارویی این گیاه حاکی از خواص ضد میکروبی، ضد التهابی، ضد درد، کاهنده‌ی تری‌گلیسرید و قند خون و نیز ضد لیشمانیایی بوده است(۱۵-۱۷). یکی از قابلیت‌های دارویی مهم این گیاه اثرات ضد باکتریایی آن است که در بررسی‌های مختلف مورد مطالعه قرار گرفته است. این گیاه دارویی به واسطه‌ی دارا بودن طیف وسیعی از متابولیت‌های ثانویه هم چون: کارواکرول، پینن‌ها و مشتقات کومارینی دارای قابلیت ضد باکتریایی چشم‌گیری می‌باشد. اسانس این گیاه دارویی که با نام دنتول شناخته می‌شود غنی از کارواکرول بوده و اثرات ضد باکتریایی و ضد بیوفیلمی آن در بررسی‌های مختلف مورد مطالعه قرار گرفته است(۱۳، ۱۸). اما قابلیت مهارکنندگی و تخریب بیوفیلم‌های حاصل استرپتوکوکوس موتانس توسط عصاره‌ی متانولی مرزه‌ی خوزستانی که دارای طیف وسیعی از متابولیت‌های ثانویه می‌باشد و نیز تعیین میزان اثربخشی ترکیبات مختلف در مهار آنزیم گلوکوزیل ترانسفراز در بررسی حاضر برای اولین بار انجام شد.

هدف از پژوهش حاضر بررسی خواص ضد باکتریایی عصاره‌ی متانولی حاصل از بخش‌های مختلف مرزه خوزستانی بر فرم منفرد و بیوفیلمی استرپتوکوکوس موتانس و نیز بررسی داکینگ مولکولی بین ترکیبات غالب این گیاه که در مطالعات فیتوشیمیایی قبلی گزارش شده‌اند با آنزیم گلوکوزیل ترانسفرازمی‌باشد.

مواد و روش‌ها

بخش آزمایشگاهی

جمع آوری نمونه‌ها، تعیین گونه و تهیه عصاره متانولی:

نمونه‌های گیاهی مورد نظر در اردیبهشت و خرداد ۱۳۹۵ طی دو مرحله قبل از گل دهی و بعد از گل دهی از مزارع پرورش سبزیجات تهران جمع آوری و در مرکز تحقیقات کشاورزی تهران مورد تایید قرار گرفت. سپس بخش‌های مختلف نمونه گیاهی شامل: برگ، ساقه، ریشه و گل جدا شده و در سایه خشک گردید. نمونه‌های خشک شده سپس آسیاب شده و ۵۰ گرم از پودر حاصل از هر بخش به طور جداگانه در ۱۵۰ میلی‌لیتر متانول ۹۶ درصد حل شده و به مدت ۷۲ ساعت بر روی شیکر با دور(rpm) ۱۶۰ قرار گرفتند. پس از مدت مذکور عصاره‌های حاصل به وسیله‌ی کاغذ صافی، صاف شده و جهت تغلیظ به روتاری ۴۵ درجه منتقل شدند و در نهایت پس از تغلیظ، عصاره‌ها به وسیله فریز درایر خشک شده و به ظروف پلاستیکی استریل منتقل و در دمای ۴ درجه نگهداری شدند. به منظور تهیه غلظت‌های مختلف از عصاره‌های حاصل میزان ۰/۰۱ گرم از عصاره‌ها در ۱۰۰۰ میکرولیتر(۵۰ درصد) DMSO (محصول شرکت سیگما، آمریکا) حل شده و پس از سترون سازی با عبور از فیلترهای ۰/۴۵ میکرونی به وسیله‌ی بافر فسفات استریل(PBS) به غلظت‌های ۳۰۰۰، ۲۵۰۰، ۲۰۰۰، ۱۵۰۰، ۱۰۰۰، ۷۵۰، ۵۰۰، ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر رقیق شدند(۱۹).

سویه مورد مطالعه و آزمون‌های ضد باکتریایی بر فرم منفرد استرپتوکوکوس موتانس:

سویه باکتریایی مورد مطالعه در این پژوهش استرپتوکوکوس موتانس(PTCC 1683) بود. جهت بررسی خواص ضد باکتریایی عصاره‌ها بر فرم منفرد سویه‌ی مذکور از روش انتشار دیسک استفاده شد. به این منظور از باکتری مورد نظر کشت ۲۴ ساعته در محیط BHI مایع(محصول شرکت مرک، آلمان) تهیه شده پس از مدت مذکور با استفاده از روش رقیق سازی و تعیین کدورت از سویه‌ی مذکور سوسپانسیونی معادل ۰/۵ مک فارلند($۱/۵\times۱۰^{۸}$ CFU/ml) تهیه شده و به وسیله‌ی سواپ استریل برسطح BHI آگار پخش شد. سپس به دیسک‌های

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 9:50 +0430 on Tuesday May 30th 2017

کاغذی استریل میزان ۲۰ میکرولیتر از عصاره‌های حاصل از بخش‌های مختلف گیاه مرزه خوزستانی در غلظت‌های ذکر شده اضافه گردید و هر کدام از دیسک‌های مورد نظر بر سطح محیط کشت داده شده قرار گرفته و در نهایت به مدت ۲۴ ساعت به انکوباتور ۳۷ درجه منتقل شدند. در این پژوهش از آنتی بیوتیک‌های استاندارد پنی سیلین(محصول شرکت پادتن طب، ایران)، به عنوان کنترل مثبت و از آب مقطر استریل وDMSO به ترتیب به عنوان کنترل منفی و کنترل حلال استفاده شد. در نهایت پس از طی مدت گرماگذاری ذکر شده هاله‌های عدم رشد ناشی از عصاره‌های گیاهی به وسیله‌ی کولیس اندازه‌گیری شد. در این مطالعه هر کدام از غلظت‌ها در ۳ تکرار انجام شده و میانگین و انحراف معیار نیز محاسبه گردید(۲۰).

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی(MIC) و حداقل غلظت کشندگی(MBC) عصاره‌ها

جهت تعیین MIC از روش ریز رقیق سازی در میکروپلیت استفاده شد. به این منظور در هر کدام از چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت BHI ریخته سپس به هر کدام از چاهک‌ها ۵۰ میکرولیتر از عصاره‌ی بخش‌های مختلف مرزه خوزستانی با غلظت‌های ۳۰۰۰-۲۳/۴ اضافه نموده و در نهایت به تمامی چاهک‌ها ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی معادل ۰/۵ مک فارلند اضافه شد. هم‌چنین برای کنترل مثبت میزان ۵۰ میکرولیتر از محلول آنتی بیوتیک پنی سیلین در محدوده غلظتی ۳۲۰۰-۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و برای کنترل حلال ۵۰ میکرولیتر DMSO به همراه ۵۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتریایی به چاهک‌های کنترل اضافه شد. پس از ۲۴ ساعت گرماگذاری میکروپلیت در دمای ۳۷ درجه جذب تمای چاهک‌ها به وسیله‌ی دستگاه الایزا خوان در ۶۲۰ نانومتر اندازی‌گیری شده و اولین چاهک‌هایی که حاوی عصاره‌ی گیاهی بوده و جذبی در ۶۲۰ نانومتر نداشتند به عنوان MIC در نظر گرفته شد. به منظور تعیین MBC نیز ۵۰ میکرولیتر از چاهک‌هایی که در آن‌ها رشد باکتری صورت نگرفته به محیط مولر هینتون آگار منتقل و پس از پخش به وسیله‌ی سواپ استریل پلیت‌هایی که حاوی کم‌ترین غلظت از عصاره‌ها بوده و در آن رشدی مشاهده نشد به عنوان MBC در نظر گرفته شد(۲۱).

آزمون بررسی مهار تشکیل فرم بیوفیلمی استرپتوکوکوس موتانس:

جهت بررسی قابلیت مهار تشکیل فرم بیوفیلمی استرپتوکوکوس موتانس به وسیله‌ی عصاره‌های گیاهی از روش نصرتی و همکاران استفاده شد. بدین منظور به هر کدام از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه ۳۰ میکرولیتر از محیط کشت BHI استریل حاوی ۱ درصد گلوکز افزوده سپس به هر کدام از چاهک‌های مذکور ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی استرپتوکوکوس موتانس حاوی $1/5\times10^5$ CFU/ml و ۵۰ میکرولیتر از عصاره‌ی متانولی حاصل از بخش‌های مختلف مرزه خوزستانی در غلظت‌های مختلف ذکر شده اضافه شد. سپس میکروپلیت حاوی سوسپانسیون باکتری، عصاره‌های گیاهی و محیط کشت به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2 گرماگذاری شد. پس از مدت مذکور جهت خارج ساختن سلول های منفرد و باقی ماندن فرم بیوفیلمی باکتری تمامی چاهک‌ها با استفاده از بافر فسفات شسته شده و جهت تثبیت بیوفیلم‌های ایجاد شده ۲۰ میکرولیتر متانول ۹۶ درصد به هر کدام از چاهک‌ها افزوده و پس از ۱۵ دقیقه مجددا چاهک‌ها به وسیله‌ی بافر فسفات شسته شد. برای محاسبه کمی میزان قابلیت عصاره‌های گیاهی در مهار ایجاد فرم بیوفیمی استرپتوکوکوس موتانس ۱۵۰ میکرولیتر از محلول ۱ درصد کریستال ویوله به چاهک‌ها افزوده و میکروپلیت به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. بعد از شستن رنگ اضافی به وسیله‌ی آب دو بار تقطیر استریل شده چاهک‌ها خشک شده و در نهایت پس از افزودن ۱۶۰ میکرولیتر استیک اسید گلاسیال به هر کدام از چاهک‌ها جذب نوری آن‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه‌گیری و میزان قابلیت مهار از طریق فرمول زیر محاسبه گردید(۲۲).

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 9:50 +0430 on Tuesday May 30th 2017

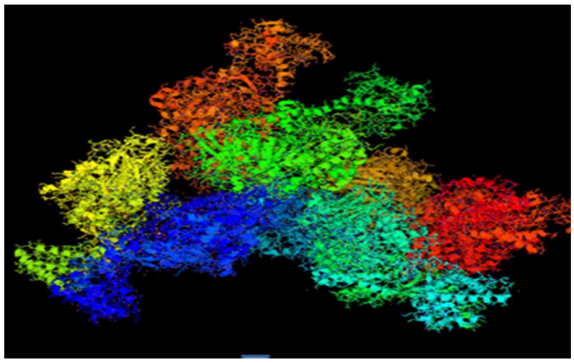
فرمول۱ : درصد مهار=$\frac{(C-B)-(T-E)}{(C-B)}\times 100$

در فرمول مذکورCمیانگین جذب کنترل منفی،B میانگین جذب چاهک‌های کنترل محیط،T میانگین جذب نوری چاهک‌های مورد آزمون و E میانگین جذب چاهک شاهد عصاره‌ی همان غلظت می‌باشند.

بخش بیوانفورماتیکی

دریافت و بهینه سازی ساختار سه بعدی آنزیم گلوکان سوکراز و ترکیبات گیاهی:

به منظور بررسی بیوانفورماتیکی قابلیت ضد باکتریایی گیاه مرزه خوزستانی ساختار سه بعدی مربوط به آنزیم گلوکان سوکراز و ۱۰ ترکیب غالب موجود در گیاه مرزه خوزستانی(جدول ۱) با ترکیب درصد بیشتر از ۰/۵ درصد که در مطالعات فیتوشیمیایی قبلی گزارش شده بود به ترتیب از پایگاه داده‌های پروتئین(PDB) به آدرس www.pdb.org با کد دسترسی 3-AIE(تصویر ۱) و پایگاه داده‌های ترکیبات شیمیایی و دارویی pubchem به آدرس pubchem.ncbi.nlm.nih.gov دریافت شد.



تصویر ۱. ساختمان سه بعدی آنزیم گلوکان سوکراز -استرپتوکوکوس موتانس

جدول ۱. ترکیبات غالب موجود در گیاه مرزه خوزستانی

ردیف	نام ترکیب	شماره دسترسی در pubchem	وزن مولکولی(گرم بر مول)	فرمول مولکولی
۱	کارواکرول	۱۰۳۶۴	۱۵۰/۲۱	$C_{10}H_{14}O$
۲	گاما-ترپینن	۷۴۶۱	۱۳۶/۲۳	$C_{10}H_{16}$
۳	پی-سیمن	۷۴۶۳	۱۳۴/۲۱	$C_{10}H_{14}$
۴	بتا بیسابولن	۱۰۱۰۴۳۷۰	۲۰۴/۳۵	$C_{15}H_{24}$
۵	میرسن	۳۱۲۵۳	۱۳۶/۲۳	$C_{10}H_{16}$
۶	کاریوفیلن	۵۳۲۲۱۱۱	۲۰۴/۳۵	$C_{15}H_{24}$
۷	لینالول	۶۵۴۹	۱۵۴/۲۴	$C_{10}H_{18}O$
۸	سیس-سابینن هیدرات	۱۶۷۳۷۰۵۲	۱۵۴/۲۴	$C_{10}H_{18}O$
۹	آلفا-توجن	۱۲۴۴۴۳۲۴	۱۳۶/۲۳	$C_{10}H_{16}$
۱۰	ترپینن-۴-ال	۱۱۲۳۰	۱۵۴/۲۴	$C_{10}H_{18}O$

داکینگ مولکولی:

جهت بررسی بیوانفورماتیکی پتانسیل مهار آنزیم گلوکان سوکراز استرپتوکوکوس موتانس توسط ترکیبات غالب موجود در گیاه مرزه خوزستانی داکینگ مولکولی بین ترکیبات غالب گیاه مذکور که در مطالعات فیتوشیمیایی قبلی گزارش شده بود با آنزیم مذکور به وسیله‌ی نرم افزار تخصصی Auto dock 4 انجام شد.در این بررسی داکینگ مولکولی در دفعات برهمکنش ۱۰۰، تعداد تکرار

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 9:50 +0430 on Tuesday May 30th 2017

۳، ناحیه‌ی برهمکنش ۳۰۰ آنگسترومی، الگوریتم ژنتیکی لاماركین، برهمکنش تصادفی لیگاند-هدف و قابلیت بررسی برهمکنش‌های هیدروژنی، واندروالسی و الکتریکی با حد آستانه‌ی ۳- کیلو ژول بر مول انجام شد. به منظور مقایسه کارایی ترکیبات گیاهی مورد بررسی در مهار گلوکان سوکراز برهمکنش بین پنی سیلین با آنزیم مذکور به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد(۲۳).

آنالیز آماری

به منظور بررسی آماری داده‌های حاصل از این پژوهش کلیه‌ی آزمایش‌ها در ۳ تکرار انجام شده و میانگین و انحراف معیار استاندارد برای آن‌ها محاسبه شد. هم‌چنین جهت بررسی اختلاف معنی دار بین گروه‌های مختلف از آنالیز آماری واریانس دو طرفه و آزمون تعقیبی دانکن با استفاده از نرم افزار تخصصی Spss نسخه ۱۹ استفاده شد.

یافته‌ها

بخش آزمایگاهی:

اثرات ضد باکتریایی مرزه خوزستانی بر فرم منفرد استرپتوکوکوس موتانس

نتایج مربوط به اثرات ضد باکتریایی عصاره‌ی متانولی بخش‌های مختلف مرزه خوزستانی بر فرم منفرد استرپتوکوکوس موتانس و MIC و MBC آن‌ها در جدول ۲ ذکر شده است.

نتایج نشان داد که عصاره‌ی بخش‌های مختلف گیاه مذکور دارای اثرات ضد باکتریایی قابل توجهی بر فرم منفرد استرپتوکوکوس موتانس در غلظت‌های مورد بررسی به ویژه غلظت‌های بالاتر از ۲۰۰۰ میکروگرم برمیلی‌لیتر است. بر اساس نتایج به دست آمده قابلیت ضد باکتریایی عصاره‌های مورد بررسی ارتباط مستقیمی با غلظت آن‌ها داشت به طوری که در مورد تمامی عصاره‌های مورد بررسی بیش‌ترین قابلیت ضد باکتریایی در بالاترین غلظت مورد بررسی یعنی ۳۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد. بررسی مقایسه‌ای اثرات ضد باکتریایی بخش‌های مختلف در سطح معنی‌داری $p<0.05$ نیز نشان داد که عصاره‌های برگ و ساقه این گیاه به ترتیب بیش‌ترین و کم‌ترین اثرات ضد باکتری را در غلظت‌های مورد بررسی داشتند. نتایج مربوط به تعیین MIC و MBC عصاره‌ها نیز نشان داد که شاخص MIC در مورد عصاره‌های مورد بررسی در طیف ۳۰۰۰-۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر قرار داشته و برگ و ساقه به ترتیب کم‌ترین و بیش‌ترین میزان را به خود اختصاص داده و از این لحاظ نتایج کاملا منطبق بر محاسبه‌ی خواص ضد باکتریایی از طریق اندازه‌گیری قطر هاله‌های عدم رشد ناشی از عصاره‌ها بود. علاوه بر این MBC مربوط به عصاره‌های مورد بررسی نیز در محدوده‌ی ۱۰۰۰ تا بالاتر از ۳۰۰۰ میکروگرم برمیلی‌لیتر تعیین شده در این بین عصاره‌ی مربوط به برگ با ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر کم‌ترین و عصاره‌ی ساقه بیش‌ترین میزان MBC را داشتند.

جدول ۲. نتایج مربوط به خاصیت ضد باکتریایی عصاره بخش‌های مختلف گیاه مرزه خوزستانی بر فرم منفرد استرپتوکوکوس موتانس(تمامی غلظت‌ها بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر بوده و اختلاف معنی‌دار داده‌ها در $p<0.05$ مورد ارزیابی قرار گرفت.)

منشا	میانگین هاله عدم رشد± انحراف معیار(میلی متر)								MIC	MBC
عصاره	۲۵۰	۵۰۰	۷۵۰	۱۰۰۰	۱۵۰۰	۲۰۰۰	۲۵۰۰	۳۰۰۰		
گل	-	-	۵±۰/۴	۶±۰/۲۵	۷±۰/۱۰	۹±۰/۲۰	۱۰±۰/۱۰	۱۱±۰/۱۴	۷۵۰	۱۵۰۰
برگ	-	۶±۰/۲۳	۷±۰/۱۱	۸±۰/۱۰	۱۰±۰/۲۶	۱۱±۰/۳۰	۱۲±۰/۲۴	۱۳±۰/۲۰	۵۰۰	۱۰۰۰
ساقه	-	-	-	-	۵±۰/۱۰	۶±۰/۲۰	۷±۰/۴۰	۸±۰/۲۵	۱۵۰۰	۲۵۰۰
ریشه	-	-	۵±۰/۱۵	۶±۰/۴۰	۷±۰/۳۰	۸±۰/۱۲	۹±۰/۱۰	۱۰±۰/۱۷	۷۵۰	۲۰۰۰
دیسک استاندارد پنی سیلین(۱۰ میلی گرم در هر دیسک)					۱۹±۰/۲۰				۱۲۵	۲۵۰

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 9:50 +0430 on Tuesday May 30th 2017

قابلیت مهار تشکیل فرم بیوفیلمی:

نتایج مربوط به قابلیت مهار تشکیل فرم بیوفیلمی استرپتوکوکوس موتانس توسط عصاره‌ی بخش‌های مختلف گیاه مرزه خوزستانی در جدول ۳ نشان داده است. نتایج به دست آمده در این خصوص نشان داد که عصاره‌های مورد بررسی در محدوده غلظتی مورد بررسی به ویژه در غلظت‌های بالاتر از ۱۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارای قابلیت مهارکنندگی بالایی می‌باشند. بر اساس نتایج به دست آمده از این بخش عصاره‌های مورد بررسی در روندی وابسته به غلظت می‌توانند موجب مهار تشکیل فرم بیوفیلمی استرپتوکوکوس موتانس شوند به طوری که بیش‌ترین میزان اثر بخشی در بالاترین غلظت مورد بررسی(۳۰۰۰میکروگرم برمیلی‌لیتر) مشاهده شد. بررسی مقایسه‌ای قابلیت مهارکنندگی عصاره‌ی بخش‌های مختلف در سطح معنی‌داری $p<0.05$ گیاه مذکور نشان داد که برگ وساقه به ترتیب با ۷۰ و ۱۳ درصد قابلیت مهارکنندگی بیش‌ترین و کم‌ترین میزان اثر بخشی را داشته‌اند.

جدول ۳. نتایج مربوط به قابلیت مهار فرم بیوفیلمی استرپتوکوکوس موتانس توسط عصاره بخش‌های مختلف گیاه مرزه خوزستانی(اختلاف معنی‌دار داده‌ها در $p<0.05$ مورد ارزیابی قرار گرفت)

منشا	میانگین میزان مهار تشکیل فرم بیوفیلمی(درصد)± انحراف معیار							
عصاره	۲۵۰	۵۰۰	۷۵۰	۱۰۰۰	۱۵۰۰	۲۰۰۰	۲۵۰۰	۳۰۰۰
گل	۱۳±۰/۵	۱۷±۰/۷	۲۶±۰/۱	۳۲±۰/۹	۳۷±۰/۳	۴۴±۰/۱	۴۶±۳	۵۰±۰/۱
برگ	۱۳±۰/۶	۲۱±۰/۸	۳۲±۰/۶	۴۰±۰/۷	۴۶±۱	۵۱±۰/۴	۵۸±۰/۲	۷۰±۰/۷
ساقه	۰	۰	۸±۰/۳	۱۳±۰/۹	۱۸±۰/۸	۲۴±۰/۹	۳۰±۰/۴	۳۳±۰/۹
ریشه	۸±۰/۳	۱۲±۱	۱۷±۰/۹	۲۶±۰/۳	۳۳±۲	۴۰±۰/۴	۴۵±۰/۹	۵۱±۲

داکینگ مولکولی:

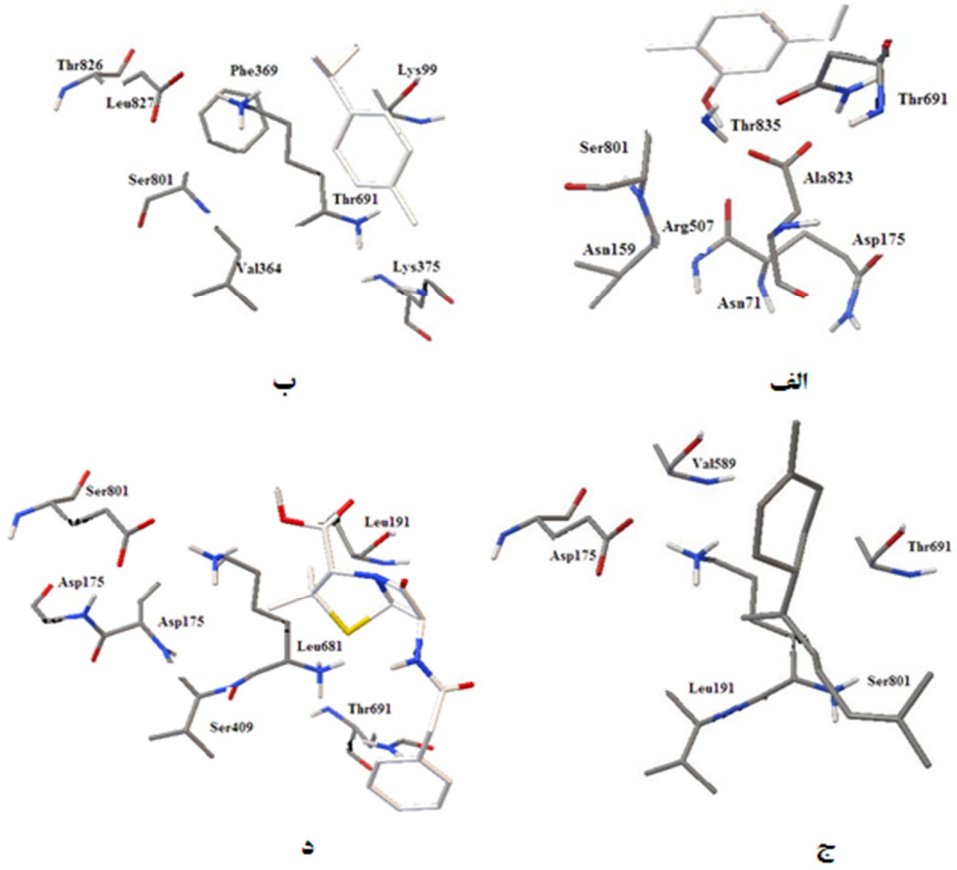
نتایج حاصل از داکینگ مولکولی بین ترکیبات غالب گیاه مرزه خوزستانی و آنزیم گلوکان سوکراز استرپتوکوکوس موتانس در جدول ۴ ذکر شده است. نتایج نشان داد که تمامی ترکیبات مورد بررسی برهمکنش قوی و مناسبی با آنزیم مذکورایجاد می‌کنند. در این بین میزان انرژی گاماترپینن، کارواکرول و بتا بیسابولن از سایر ترکیبات بیشتر بود. بررسی ناحیه‌ی برهمکنش ترکیبات گیاهی مورد بررسی با آنزیم گلوکان سوکراز نیز نشان داد که ۵ اسیدآمینه شامل: Asp175, Leu191, Thr691, Arg731, Ser801 فعال‌ترین باقی مانده‌های اسید آمینه‌ای در برهمکنش با ترکیبات مورد بررسی بودند(تصویر ۱). مقایسه‌ی انرژی برهمکنش این اسید آمینه‌ها نشان داد که Thr691 در برهمکنش با تمامی ترکیبات مشارکت دارد. علاوه بر این بررسی هیدروپاتی اسیدآمینه‌های مشارکت کننده در برهمکنش و نوع پیوندهای شکل گرفته بین ترکیبات گیاهی و آنزیم گلوکان سوکراز نشان داد که اسیدآمینه‌های آبدوست و پیوندهای واندروالس اصلی‌ترین عوامل در ایجاد برهمکنش بین آنزیم مذکور و ترکیبات گیاهی بودند.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ٤ . نتایج مربوط به داکینگ مولکولی بین گلوکان سوکراز استرپتوکوکوس موتانس وترکیبات غالب مرزه خوزستانی

ردیف	نام ترکیب	انرژی اتصال(کیلوژول بر مول)	اسیدآمینه‌های درگیر در برهمکنش
۱	کارواکرول	-۱۱/۳	Thr835,Ala823, Ser801,Thr691,Arg507,Asp175,Asn159,Asn71
۲	گاما-ترپینن	-۱۱/۱	Thr826,Leu827, Ser801,Thr691, Phe369,Lys375,Val364,Lys99
۳	پی-سیمن	-۸/۹	Ala701,Lys697,Thr691,Leu405
۴	بتا بیسابولن	-۱۰/۸	Ser801, Thr691,Val589, Asp175, Leu191
۵	میرسن	-۹/۱	Arg731, Ala701, Thr691, Ala261
۶	کاریوفیلن	-۷/۷	, Ser801, Thr691, Trp272, His267
۷	لینالول	-۵/۶	Thr691, Asp175, Leu191,
۸	سیس-سابینن هیدرات	-۶/۸	Arg731, Thr691, Ala156
۹	آلفا-توجن	-۶/۵	Ser801, Thr69 Asp175, Leu191
۱۰	ترپینن-۴-ال	-۵/۳	Thr691, Arg731
۱۱	پنی سیلین	-۱۲/۱	Ser801, Thr691, Leu681,Ser409, Asp175, Leu191,



شکل ۱ . نحوه‌ی بر همکنش ترکیبات غالب مرزه خوزستانی با گلوکان سوکراز استرپتوکوکوس موتانس(الف:کارواکرول، ب: گاماترپینن، ج: بتا-بیسابولن، د: پنی سیلین)

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 9:50 +0430 on Tuesday May 30th 2017

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 9:50 +0430 on Tuesday May 30th 2017

بحث

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که عصاره‌ی مرزه‌ی خوزستانی دارای قابلیت ضد باکتریایی بالایی بر فرم منفرد استرپتوکوکوس موتانس بوده و به صورت موثری می‌تواند از ایجاد فرم بیوفیلمی این باکتری جلوگیری نماید.

پوسیدگی دندان یکی از مهم‌ترین چالش‌های پیش روی سلامت عمومی در کشورهای مختلف است. به علت تحمیل هزینه‌های زیاد و نبود راهکار درمانی یا پیشگیری کننده‌ی قطعی برای این معضل تحقیقات انجام شده در خصوص مهار یا کنترل پوسیدگی دندان از اولویت‌های پژوهشی نهادهای مرتبط با سلامت عمومی در کشورهای مختلف است. به علت حساس بودن محیط دهان و امکان پذیر نبودن استفاده از هر نوع ماده‌ی ضد میکروبی تحقیق و پژوهش در این خصوص با چالش جدی مواجه است. با توجه به اینکه بیوفیلم‌های باکتریایی خصوصا بیوفیلم‌های استرپتوکوکوس موتانس به عنوان عامل اصلی ایجاد پوسیدگی شناخته شده است، لذا معرفی ترکیبات طبیعی با قابلیت مهار تشکیل فرم بیوفیلمی یا تخریب بیوفیلم‌های تشکیل شده‌ی باکتری مذکور با اثرات جانبی و اثربخشی بالا از همیت بالایی برخوردار است(۲۴، ۲۵). در این بین ترکیبات گیاهی با خواص ضد باکتریایی و مهارکننده‌ی تشکیل بیوفیلم باکتریایی به علت ارزان و در دسترس بودن و نیز اثرات جانبی کمتر از جایگاه ویژه‌ای برخوردارند. در این راستا تاکنون پژوهش‌های مختلفی انجام شده و قابلیت ضد باکتریایی گیاهان مختلف بر استرپتوکوکوس موتانس مورد تایید قرار گرفته است. نصرتی و همکاران در پژوهش خود نشان دادند که عصاره‌ی متانولی حاصل از بخش‌های مختلف گیاه جاشیر قابلیت ضد باکتریایی چشم‌گیری بر فرم منفرد استرپتوکوکوس موتانس بوده و به صورت موثری ایجاد فرم بیوفیلمی این باکتری را مهار می‌کند(۲۲). در پژوهشی مشابه که توسط چاوان و همکاران انجام شد قابلیت ضد استرپتوکوکوس موتانس عصاره‌ی آبی چند گیاه دارویی مختلف مورد بررسی قرار گرفته و مشخص شد که *Syzygium aromaticum* قابلیت ضد باکتریایی بالایی بر فرم منفرد باکتری مذکور بوده و می‌تواند به طور چشم‌گیری از ایجاد فرم بیوفیلمی آن جلوگیری نماید(۲۶). گوماش و همکاران نیز در بررسی دیگر نشان دادند که عصاره‌ی استونی حاصل از بخش‌های مختلف *Psidium guajava* به صورت چشمگیری می‌تواند ایجاد فرم بیوفیلمی استرپتوکوکوس موتانس را مهار کند(۲۷). اما در مقابل برخی از مطالعات حاکی از عدم اثر بخشی گیاهان مختلف بر فرم منفرد و بیوفیلیمی استرپتوکوکوس موتانس بوده است. پژوهش انجام شده توسط میرکریمی و همکاران و در خصوص اثر بخشی عصاره‌ی دانه‌ی انگور بر فرم منفرد استرپتوکوکوس موتانس حاکی از عدم اثربخشی این عصاره بر باکتری مذکور بوده است(۲۸). در همین راستا مطالعه‌ی انجام شده توسط آنگاجی و همکاران عدم اثربخشی عصاره‌ی آبی ۴ گونه گیاه دارویی شامل: Thymus vulgaris, Melissa officinalis, Rhus corriaria و Magnolia grandiflora را بر استرپتوکوکوس نشان داد در حالی که قالیت ضد باکتریایی بالایی از آن‌ها بر سایر سویه‌های باکتریایی مشاهده شده بود(۲۹).

مرزه خوزستانی یکی از گیاهان بومی ایران است که اثرات مطلوب درمانی آن در بررسی‌های مختلفی مورد بررسی قرار گرفته است. یکی از خواص مورد توجه این گیاه دارویی با ارزش که بسیار مورد توجه است قابلیت بالای ضد باکتریایی آن است که در پژوهش‌های مختلفی مورد ارزیابی و تایید قرار گرفته است. در همین راستا بررسی انجام شده توسط محبوبی و همکاران نشان داد که اسانس تهیه شده از مرزه‌ی خوزستانی قابلیت ضد باکتریایی چشم‌گیری بر نمونه‌های کلینیکی اشریشیا کولای جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت‌های مجاری ادراری را دارد(۳۰). در بررسی مشابه دیگر عباسی و همکاران نشان دادند که اسانس مرزه خوزستانی اثرات ضد باکتریایی بالایی بر سویه‌های مقاوم به آنتی بیوتیک سودوموناس آئروژنوزا دارد(۳۱). بررسی زمردیان و همکاران در خصوص اثرات ضد باکتریایی اسانس گیاهان دارویی بومی ایران از جمله

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 9:50 +0430 on Tuesday May 30th 2017

مرزه خوزستانی بر باکتری‌های مولد بیماری‌های دهان و دندان شامل استرپتوکوکوس موتانس و استرپتوکوکوس سوبرینوس حاکی از اثرات ضد باکتریایی بالای مرزه خوزستانی بر این باکتری‌ها بوده اما در این پژوهش فقط کارواکرول عامل اصلی ظهور قابلیت ضد باکتریایی مطرح شده و اثربخشی گیاهان مورد مطالعه بر فرم بیوفیلمی باکتری‌های مذکور که عامل اصلی پوسیدگی و بیماری‌های دهان و دندان می‌باشند مورد بررسی قرار نگرفته است(۳۲).

بررسی‌های فیتوشیمیایی مختلف انجام شده در خصوص ترکیبات موجود در مرزه خوزستانی حاکی از حضور طیف وسیعی از متابولیت‌های ثانویه در این گیاه است. در این بین کارواکرول، مشتقات کومارینی و پینن‌ها درصد بیشتری را به خود اختصاص داده‌اند. طی بررسی‌های مختلف انجام شده کارواکرول به عنوان ماده موثر غالب گیاه مذکور معرفی شده و قابلیت دارویی به ویژه اثرات ضد باکتریایی ترکیب مذکور در بررسی‌های متعدد مورد مطالعه قرار گرفته است(۳۳).

بررسی اکبری شهابی و همکاران نشان داد که کارواکرول اثرات ضد میکروبی به مراتب بالاتری نسب به آمپی سیلین و سولفامتوکسازول بر لیستریامونوسیتوژنز دارد(۳۴). مطالعه‌ی ناسترو و همکاران نیز نشان داد که کارواکرول قابلیت بالایی در مهار تشکیل فرم بیوفیلمی استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس را دارد اما در این پژوهش مکانیسم احتمالی برای دلیل ظهور این قابلیت معرفی نشده است(۳۵). در پژوهشی مشابه که توسط آمارال و همکاران انجام شد مشخص شد که کارواکرول و تیمول می‌توانند به طور موثری ایجاد فرم بیوفیلمی سویه‌های مختلف سالمونلا بروی غشاهای پلی پروپیلنی را کاهش دهند(۳۶). اگر چه در بررسی‌های مختلف دیگر کارواکرول به عنوان عامل اصلی ایجاد قابلیت ضد باکتریایی مرزه خوزستانی معرفی شده اما نقش سایر ترکیبات موجود در این گیاه کمتر مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که سایر ترکیبات موجود در مرزه خوزستانی به ویژه مشتقات کومارینی و پیننی در ظهور قابلیت ضد بیوفیلمی گیاه مذکور حائز اهمیت می‌باشند. بررسی‌های مختلف انجام شده اثرات ضد باکتریایی کومارین‌ها و پینن‌ها را نشان داده است. در بررسی نصرتی و همکاران مشخص شد که پینن‌ها و مشتقات مخلف کومارینی موجود در گیاه جاشیر می‌توانند به صورت موثری آنزیم گلوکان سوکراز استرپتوکوکوس موتانس را مهار نمایند(۲۲). قابلیت ضد میکروبی بالای ترکیباتی هم چون گاما ترپینن و بتا بیسابولن که در پژوهش حاضر قابلیت بالای در مهار آنزیم گلوکان سوکراز نشان دادند در بررسی‌های مختلفی تایید شده است(۳۳، ۳۷-۴۰). بنابر این این ترکیبات در کنار کارواکرول میتوانند گزینه‌ی مناسبی جهت بررسی بیشتر از لحاظ اثر بخشی و ایمنی و هم‌چنین توسعه محصولات دارویی و بهداشتی جهت مبارزه با معضل پوسیدگی دندان تلقی شوند. اثربخشی بالای بخش‌ها هوایی مرزه خوزستانی می‌تواند ناشی از تجمع کارواکرول، مشتقات پیننی و کومارینی در این بخش‌ها باشد که بررسی‌های مختلف فیتوشیمیایی تایید کننده‌ی این گفته می‌باشند.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که عصاره‌ی بخش‌های مهتلف به ویژه بخش‌های هوایی مرزه خوزستانی قابلیت ضد باکتریایی بالیی بر فرم منفرد استرپتوکوکوس موتانس بوده و به واسطه‌ی دارا بودن طیف وسیعی از متابولیت‌های گیاهی به ویژه گاماترپینن، کارواکرول و بتا بیسابولن می‌تواند از ایجاد فرم بیوفیلمی استرپتوکوکوس موتانس و به دنبال آن از ایجاد پوسیدگی دندان جلوگیری کند.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله نویسندگان مقاله از اساتید گروه بیوتکنولوژی دانشکده فناوری‌های نوین دانشگاه اصفهان تشکر و قدردانی می‌نمایند.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 9:50 +0430 on Tuesday May 30th 2017

منابع

1. Forssten, S.D., M. Björklund, and A.C. Ouwehand, Streptococcus mutans, caries and simulation models. Nutrients, 2010. 2(3): p. 290-298.
2. Loesche, W.J., Role of Streptococcus mutans in human dental decay. Microbiological reviews, 1986. 50(4): p. 353.
3. Nishimura, J., et al., Biofilm formation by Streptococcus mutans and related bacteria. Advances in Microbiology, 2012. 2(03): p. 208.
4. Irague, R., et al., Combinatorial engineering of dextransucrase specificity. PloS one, 2013. 8(10): p. e77837.
5. Ito, K., et al., Crystal structure of glucansucrase from the dental caries pathogen Streptococcus mutans. Journal of molecular biology, 2011. 408(2): p. 177-186.
6. Leemhuis, H., et al., Glucansucrases: Three-dimensional structures, reactions, mechanism, α-glucan analysis and their implications in biotechnology and food applications. Journal of biotechnology, 2013. 163(2): p. 250-272.
7. Banas, J.A., Virulence properties of Streptococcus mutans. Front Biosci, 2004. 9(10): p. 1267-77.
8. Monchois, V., R.-M .Willemot, and P. Monsan, Glucansucrases: mechanism of action and structure–function relationships. FEMS Microbiology Reviews, 1999. 23(2): p. 131-151.
9. Anastasaki, E., et al., Comparative study of biological activities of Crocus sativus L. extracts and Lamiaceae plants' extracts. 2016.
10.Beheshti-Rouy, M., et al., The antibacterial effect of sage extract (Salvia officinalis) mouthwash against Streptococcus mutans in dental plaque: a randomized clinical trial. Iranian journal of microbiology, 2015. 7 :(۳)p. 173.
11. GONçALVES, G., M. Bottaro, and A. Nilson, Effect of the Thymus vulgaris essential oil on the growth of Streptococcus mutans. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, 2012. 32(3): p. 375-380.
12. Nascimento, G.G., et al., Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. Brazilian journal of microbiology, 2000. 31(4): p. 247-256.
13. Raei, F., et al., Chemical composition and antibacterial activity of Teucrium polium essential oil against urinary isolates of Klebsiella pneumoniae. Journal of Essential Oil Research, 2014. 26(1): p. 65-69.
14. Nosrati, M. and M. Behbahani, Molecular Docking Study of HIV-1 Protease with Triterpenoides Compounds from Plants and Mushroom. Arak University of Medical Sciences Journal, 2015. 18(3): p. 67-79.
15. Malmir, M., et al., Characterization of Satureja khuzestanica Leaf as a Herbal Medicine. Microscopy and Microanalysis, 2014. 20(05): p. 1425-1435.
16. Pirbalouti, A.G., et al., Inhibitory activity of Iranian endemic medicinal plants against Vibrio parahaemolyticus and Vibrio harveyi. Journal of Medicinal Plants Research, 2011. 5(32): p. 7049-7053.
17. Sadeghi-Nejad, B., et al., Antifungal activity of Satureja khuzestanica (Jamzad) leaves extracts. Jundishapur J Microbiol, 2010. 3: p. 36-40.
18. Momtaz, S., A SYSTEMATIC REVIEW OF THE BIOLOGICAL ACTIVITIES OF SATUREJA L. 2008.
19. Nosrati, M. and M. behbahani, The effects of the Methanolic Extracts of Prangos Uloptera and Crossoptera on the Growth, Mutagenicity and Proliferation of Human Lymphocytes, Based on Ames Test. Journal of Babol University Of Medical Sciences, 2015. 17(6): p. 64-73.
20. Nosrati, M. and M. Behbahani, Antibacterial Activity of Methanol Extracts from Different Parts of Prangos crossoptera and their Synergistic Effect on Some Antibiotics. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences, 2015. 25(129): p. 92-101.
21. Ramalivhana, J., et al., Antibacterial activity of honey and medicinal plant extracts against Gram negative microorganisms. African Journal of Biotechnology, 2014. 13(4.(
22. Nosrati, M. and M. Behbahani, In Vitro and in Silico Evaluation of Antibacterial Effect of Methanolic Extracts of Prangos Ferulacea on Single and Biofilm Structure of Streptococcus Mutans. The Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, 2016. 23(11): p. 1049-1062.
23. Herowati, R. and G.P. Widodo, Molecular Docking Studies of Chemical Constituents of Tinospora cordifolia on Glycogen Phosphorylase. Procedia Chemistry, 2014. 13: p.63-68.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 9:50 +0430 on Tuesday May 30th 2017

24. Bagramian, R.A., F. Garcia-Godoy, and A.R. Volpe, The global increase in dental caries. A pending public health crisis. Am J Dent, 2009. 22(1): p. 3-8.
25. Ozdemir, D., Dental caries and preventive strategies. Journal of Educational and Instructional Studies in the World, 2014.
26. Chavan, N., R. Phadtare, and T. Chavan, Effect of aqueous extracts of different medicinal plants on control of Streptococcus mutans. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci, 2015. 4(4): p. 1072-1081.
27. Gomashe, A.V., A.A .Sharma, and A. Kasulkar, Investigation of biofilm inhibition activity and antibacterial activity of Psydium guajava plant extracts against Streptococcus mutans causing dental plaque. Internat J Curr Microbiol Appl Sci, 2014. 3: p. 335-51.
28.Mirkarimi ,M., et al., The Antimicrobial Activity of Grape Seed Extract against Two Important Oral Pathogens .zahedan journal of medical science ,15(1).2015 :p. 43-46.
29.Angaji, E.B.S.A. and S.M. Angaji, Antimicrobial effects of four medicinal plants on dental plaque. Journal of Medicinal Plants Research, 2009. 3(3): p. 132-137.
30.Mahboubi, M. and N. Kazempour, The Antibacterial Activity of Satureja khuzestanica Essential Oil Against Clinical Isolates of E. coli. Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products, 2016(In Press.(
31.Abbasi, A., et al., The study of inhibitory effects of satureja khuzestanica against MDR isolates of pseudomonas aeruginosa. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci, 2014. 3(2): p. 614-618.
32.Zomorodian, K., et al., Antimicrobial activity of seven essential oils from Iranian aromatic plants against common causes of oral infections. Jundishapur journal of microbiology, 2015. 8(2.(
33.Siavash Saei-Dehkordi, S., et al., Chemical composition, antioxidative capacity and interactive antimicrobial potency of Satureja khuzestanica Jamzad essential oil and antimicrobial agents against selected food-related microorganisms. International Journal of Food Science & Technology, 2012. 47(8): p. 1579-1585.
34.Akbari-Shahabi, S., et al., Evaluation of antibacterial activity of Satureja khuzestanica J. essential oil against standard and isolated strains of Listeria monocytogenes. zahedan journal of medical science,10(16).2016 :p. 38-41.
35.Nostro, A., et al., Effects of oregano, carvacrol and thymol on Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis biofilms. Journal of medical microbiology, 2007. 56(4): p. 519-523.
36.Amaral, V., et al., Effect of carvacrol and thymol on Salmonella spp. biofilms on polypropylene. International Journal of Food Science & Technology, 2015. 50(12): p. 2639-2643.
37.Giweli, A., et al., Antimicrobial and antioxidant activities of essential oils of Satureja thymbra growing wild in Libya. Molecules, 2012. 17(5): p. 4836-4850.
38.Jagannath, N., et al., Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of Heracleum rigens. Natural product communications, 2012. 7(7): p. 943-946.
39.Leandro, L.M., et al., Chemistry and biological activities of terpenoids from copaiba (Copaifera spp.) oleoresins. Molecules,17(4).2014 :p. 3866-3889.
40.Oyedemi, S., et al., The proposed mechanism of bactericidal action of eugenol,[alpha]-terpineol and g-terpinene against Listeria monocytogenes, Streptococcus pyogenes, Proteus vulgaris and Escherichia coli. African Journal of Biotechnology, 2009. 8(7): p. 1280.

www.SID.ir