

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

\*اسماء تیموری: کارشناس ارشد زیست‌شناسی گرایش میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد واحد کرمان، کرمان، ایران (نویسنده مسئول). teymuri.as@gmail.com

محمد بکاآیان: 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 پذیرش: ۹۵/۹/۱۵

تاریخ دریافت: ۹۵/۶/۲۷

### 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 میرابلیس بررسی گردید. تست کمترین غلظت مهارکنندگی و بیش‌ترین غلظت مهارکنندگی به روش میکروتیتراپلنت 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 عصاره مرزه ۱۲/۵ ppm بوده که در برابر پروتئوس میرابلیس 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

دلیل تنوع در اتصال به سطوح در زمینه‌های زیادی از جمله 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. از آنجایی که این باکتری‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف مقاوم می‌باشد امروزه از عصاره‌های گیاهی برای از

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

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 ( $ATCC®19615^{TM}$ )، استرپتوکوکوس پنومونیه ( $ATCC® 49619^{TM}$ )، استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس ( $ATCC® 15305^{TM}$ )، پروتئوس میسراییلیس ( $ATCC® 35659^{TM}$ )، استافیلوکوکوس اورئوس ( $ATCC® 25923^{TM}$ ) می‌باشد که از مرکز آراین مهر تهران به‌صورت ویال لیوفیلیزه تهیه شد. سوسپانسیون حاصل به محیط کشت استریل بلاد آگار، نوترینت برات 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 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 ضد میکروبی 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

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 نعنائیان، 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 ضد عفونت کاربرد دارد (۸ و ۹). مرزه حاوی فلاونوئیدهایی از جمله کاراکرول، تیمول،  $\delta$  ترپین، p سیمنی، آلفا و بتا پینین است (۱۰). کاراکرول مهم‌ترین ترکیب اسانس گونه‌های مرزه است که دارای خاصیت ضد عفونی‌کننده و ضد میکروبی است (۱۱). در این مطالعه اثر ضد میکروبی عصاره مرزه در تشکیل بیوفیلم در برخی پاتوژن‌های باکتریال مهم انسان مورد بررسی قرار گرفته 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 عصاره‌گیری، عصاره‌های به دست آمده با استفاده از دستگاه روتاری (تقطیر در خلأ) در دمای ۴۰ تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد تغلیظ می‌شوند و در دمای ۴۰-۵۰ 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.

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 الیزا ریدر که روی طول موج ۴۹۲ نانومتر تنظیم شده قرار می‌دهیم (۱۵).

#### یافته‌ها

نتایج حاصل از تعیین حساسیت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها نشان داد که باکتری استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های اریترومایسین، سفکسیم، تتراسایکلین مقاومت نشان داده است. بعد از دیسک‌گذاری 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،

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 (MIC - Minimum 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 برات و TSB اضافه شد. به چاهک اول ۱۰۰ میلی‌لیتر از محلول رقیق شده عصاره (۱۰ میلی‌گرم از عصاره در یک سی‌سی از حلال (DMSO) دی‌متیل 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 (پارافیلیم) در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۷ درجه

جدول ۱- نتایج حداقل غلظت مهارکننده و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی عصاره گیاه مرزه در برابر پاتوژن‌های انسانی

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

TE = تتراسایکلین

CF = سفتازیدیم

CE = سفکسیم

E = اریترومایسین

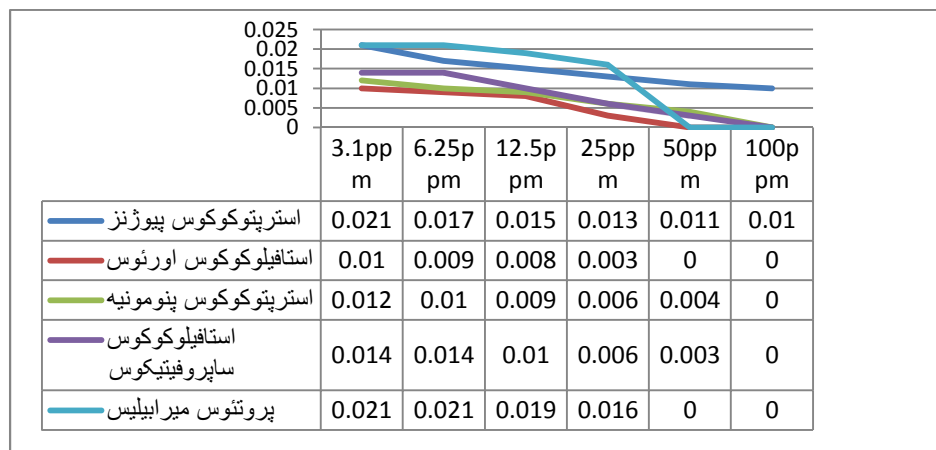
جدول ۲- الگوی شدت بازدارندگی عصاره مرزه در برابر پاتوژن‌های انسانی در غلظت‌های مختلف

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

++ نشان دهنده رشد زیاد میکرواورگانیزم‌ها

+ نشان دهنده رشد کم میکرواورگانیزم

- نشان دهنده عدم رشد میکرواورگانیزم



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

(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 ۱۰۰ ppm به‌طور کامل مانع تشکیل بیوفیلم باکتری‌های استرپتوکوکوس پنومونیه و استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس شده است و همچنین در غلظت‌های ۱۰۰ ppm و ۵۰ ppm تشکیل بیوفیلم باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و پروتئوس میرابیلیس صفر بوده در صورتی که 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

تتراسایکلین مقاومت نشان داده است. نتایج حاصل از بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره مرزه نشان داد که کمترین غلظت مهارکنندگی ۱۲/۵ ppm در برابر باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و پروتئوس میرابیلیس مشاهده شد که یک باکتری گرم منفی بوده است در حالی که بیشترین غلظت مهارکننده در برابر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس مشاهده شد که غلظت ۵۰ ppm 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 ۳/۱ ppm بود که در برابر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس مشاهده شد، در حالی که بیش‌ترین غلظت مهارکنندگی ۱۲/۵ ppm بود که باکتری‌های استرپتوکوکوس پیوژنز، استرپتوکوکوس پنومونیه و استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس را مهار کرده است

آژروجنوزا، کلبسیلا اُکسیتوکا، کلبسیلا پنومونیه، به ترتیب  $250, 250, 1500 > 250, 250, 125$  و  $250$  میکروگرم بر میلی لیتر است (۱۸). در مطالعات اوز کالپ نتایج نشان داد اسانس مرزه با غلظت‌های  $70, 80, 90$  و  $100$  میکروگرم بیش‌ترین اثر مهارکنندگی را بر روی باکتری‌های استرپتوکوکوس پنومونیه، سالمونلا انتریدیس، کلبسیلا پنومونیه، اشرشیا کولی، پسودوموناس آژروجنوزا و استرپتوکوکوس موتانس دارد (۱۹). مطالعات میهاجیلاو-کرسیتیو و همکاران نشان داد که حجم MIC (حداقل غلظت مهارکنندگی) و MBC (حداقل غلظت کشندگی) اسانس مرزه  $25-78/0$  میکرولیتر بر میلی لیتر 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 لوتسه 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،  $25$  میلی متر بوده است (۲۲). نتایج گالوک و همکاران نشان داد که قطر هاله مهاری اسانس مرزه در برابر باکتری‌های باسیلوس سوبتیلیس، اشرشیا کولی، کلبسیلا پنومونیه، پروتئوس ولگاریس، استافیلوکوکوس اورئوس و استرپتوکوکوس پنومونیه به ترتیب  $21, 18, 23$ ،  $18, 22$  و  $21$  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 از جمله 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 تفاوت‌های چشمگیری دارد (۲۴). در همین راستا کاوار و همکاران در

غلظت مهارکنندگی عصاره گیاه مرزه در برابر باکتری‌های مورد مطالعه غلظت  $12/5$  ppm بوده است که در برابر باکتری پروتئوس میرابیلیس مشاهده شده است که یک باکتری گرم منفی بوده است در حالی که بیشترین غلظت مهارکنندگی در برابر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس مشاهده شده که غلظت  $50$  ppm 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  $2002$  برای تعیین میزان فعالیت ضد باکتریایی اسانس  $3$  گونه از مرزه به نام‌های *S.boissieri* و *S.pilosa, S.coeralen* بر باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، سودوموناس آژروژینوزا، اشرشیاکلی و سالمونلا تیفی موریوم از روش میکرودیلیشن استفاده کردند، نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که میزان کمترین غلظت مهارکنندگی این  $3$  گونه مرزه برای سودوموناس آژروژینوزا و اشرشیاکلی  $125$  میلی گرم بر میلی لیتر و برای استافیلوکوکوس اورئوس و سالمونلا تیفی موریوم در محدوده  $62/5-125$  میلی گرم بر میلی لیتر می‌باشد (۱۶). محبوبی و کاظم پور در سال  $2011$  در تحقیقی به بررسی اسانس *Satureja hortensis* پرداختند. در این بررسی با روش میکرودیلیشن برات فعالیت این گونه از مرزه علیه باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، سودوموناس آژروژینوزا، اشرشیاکلی و سالمونلا تیفی موریوم ارزیابی شد. در این مطالعه سودوموناس آژروژینوزا به اسانس مرزه مقاومت بیشتری نشان داد، در حالی که استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیا کلی نسبت به آن حساس تر بودند، به طوری که میزان MIC برای استافیلوکوکوس اورئوس  $2$  میلی لیتر بر میلی لیتر اشرشیا کلی و سالمونلا تیفی موریوم  $1$  میلی لیتر بر میلی لیتر و سودوموناس آژروژینوزا  $8$  میلی لیتر بر میلی لیتر بود (۱۷). در مطالعات تیموری نتایج نشان داد که غلظت مهارکنندگی (MIC) اسانس گیاهی مرزه برای باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، میکروکوکوس لوتئوس، باسیلوس سرئوس، باسیلوس سوبتیلیس، پسودوموناس

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 آن‌ها در مناطق بومی و معرفی نژادهای برتر مورد بررسی قرار گیرد.

### تقدیر و تشکر

از کلیه کسانی که به سرانجام رساندن این تحقیق همراهی نموده‌اند و باکرامتی چون خورشید، سرزمین دل را روشنی بخشیدند و گلشن سرای علم ودانش را با راهنمایی‌های کارساز و سازنده بارور ساختند، صمیمانه و صادقانه 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

سال ۲۰۰۸ اشاره کردند که فاکتورهای 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، در حالی که در بررسی‌های گذشته به ارزیابی این خاصیت در اسانس گونه‌های مختلف مرزه پرداخته شده است. همچنین در تحقیقات گذشته بیشتر به ارزیابی این خاصیت در گونه‌هایی غیر از مرزه بختیاری پرداخته‌اند.

نتایج حاصل از بررسی اثر عصاره مرزه بر روی تشکیل بیوفیلم پاتوژن‌های انسانی نشان داده است که عصاره گیاه در غلظت ۱۰۰ ppm به‌طور کامل مانع تشکیل بیوفیلم باکتری‌های استرپتوکوکوس پنومونی و استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس شده است و همچنین بیوفیلم باکتری استرپتوکوکوس پیورنز در غلظت‌های مختلف از عصاره تشکیل شده است اما به میزان کم مشاهده شده است. تشکیل بیوفیلم سبب می‌شود که باکتری‌ها به عوامل ضد میکروبی مقاوم شوند. اولین مرحله تشکیل بیوفیلم اتصال سلول‌های باکتری به سطوح می‌باشد که عوامل زیادی از جمله حرکت باکتری‌ها، هیدروفوبیسیته 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 نعنای 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 بیوفیلم‌ها پس از تشکیل سخت و طاقت فرسا است و بهتر است از تشکیل بیوفیلم جلوگیری شود. از طرف دیگر کاهش تشکیل بیوفیلم در

- 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. Čavar 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.
- 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, Satl F, Kürkçüoğlu M, Hüsni 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 bachtiarica bunge* in Ardebil province]. *Iranian 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

## 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](mailto:teymuri.as@gmail.com)

**Mohammad Bokaeian**, PhD, Department of Microbiology, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran. [bokaeian.m@gmail.com](mailto: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](mailto: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