Journal of
Arak University of Medical Sciences

October & November 2019. Vol 22. Issue 4

Research Paper

Antibacterial Activity and Antibiofilm Properties of Satureja Essential Oil Against Periodontal Pathogens

Ali Iranpoor[1], Mojtaba Bayani[2], Mohammad Arjomandzadegan[3], *Afrooz Nakhostin[4]

1. Dentist, Arak, Iran.
2. Department of Periodontics, School of Dentistry, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.
3. Tuberculosis and Pediatrics Infectious Diseases Research Center, Department of Microbiology and Immunology, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.
4. Department of Restorative and Aesthetic Dentistry, School of Dentistry, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.

Use your device to scan and read the article online

Citation: Iranpoor A, Bayani M, Arjomandzadegan M, Nakhostin A. [Antibacterial Activity and Antibiofilm Properties of Satureja Essential Oil Against Periodontal Pathogens (Persian)]. Journal of Arak University of Medical Sciences (JAMS). 2019; 22(4):16-27. https://doi.org/10.32598/JAMS.22.4.20

https://doi.org/10.32598/JAMS.22.4.20

CC BY NC

Article Info:
Received: 20 May 2019
Accepted: 25 Aug 2019
Available Online: 01 Oct 2019

Keywords:
Periodontal pathogens, Satureja plant, Antibacterial activity, Antibiofilm

ABSTRACT

Background and Aim Periodontal diseases are among the most prevalent inflammatory diseases caused by oral bacteria. Expansion of oral biofilm causes various diseases such as gingival inflammation and periodontitis. The Satureja plant has various species, all of which are aromatic. This plant is traditionally used for the treatment of some diseases. The present study was conducted to evaluate the effect of Satureja essential oil on periodontal pathogens.

Methods and Materials In this study, we evaluated four pathogens; *Enterococcus faecalis*, Streptococcus sanguinis, Eikenella corrodens, and Actinomyces viscosus. We also used the disk diffusion test and broth microdilution method to evaluate the antimicrobial effect of Satureja essential oil. Finally, we determined the minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration.

Ethical Considerations The Ethics Committee of Arak University of Medical Sciences approved this study (Code: IR.ARAKMU.REC.1397.67).

Results In concentration of 0.1 g/mL of Satureja plant, Actinomyces viscosus, Streptococcus sanguinis, Enterococcus faecalis, and Eikenella corrodens were found to be sensible to resistance. The Satureja essential oil had the highest effect on Eikenella corrodens. Results obtained from the biofilm test showed no biofilm in a concentration of 12.5 mg/mL and higher of Satureja plant.

Conclusion The Satureja plant was found to have an antibacterial and inhibitory effect on biofilm growth and formation in the oral cavity.

Extended Abstract

1. Introduction

Tooth decay and periodontal disease are the most common infectious human diseases that are caused by oral bacteria such as Staphylococcus aureus, Micrococcus, Pseudomonas, Candida, etc. [1]. Various ways, such as chemical mouthwashes, toothpaste, and antibiotics, are used to prevent and treat periodontal disease and tooth decay [10, 11, 13].

Herbal and other natural antibacterial materials are now considered as useful and alternative antibacterial methods for oral and toothpaste washing [14]. Satureja has numerous compounds with antibacterial properties [15].

* *Corresponding Author:*
Afrooz Nakhostin, MD.
Address: Department of Restorative and Aesthetic Dentistry, School of Dentistry, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.
Tel: +98 (918) 3602208
E-mail: afr_na_sa@yahoo.com

Since the oral environment contains many bacterial species and the use of chemical drugs in the oral cavity is associated with complications such as changes in the natural flora, in this study, we investigated the effect of Satureja oil on some common oral bacteria.

2. Materials and Methods

This experimental study was performed on microbial strains provided from Iran Microbial Bank (including Enterococcus faecalis, Streptococcus sanguis, Eikenella corrodens, and Actinomyces viscose). Some fresh Satureja was obtained from the Research Center for Medicinal Plants of Shahid Beheshti University, and its essential oil by water distillation or Clevenger apparatus.

The disk diffusion method was used to determine microbial susceptibility to essential oil after preparation of microbial suspension at half McFarland concentration and its culturing as aqueous media on Muller-Hinton Agar medium. The blank disk was immersed in 20 µL of essential oil with concentrations of 1 g/mL and 0.1 g/mL on the culture medium and placed at a suitable distance from the plate incubated at 37°C for 48 hours. After the incubation period, the bacterial growth inhibition zone diameter was measured in millimeters. The experiment was repeated 3 times, and the mean results was reported.

The microplate dilution method was also used to determine the antimicrobial effect of the essential oil. Median inhibitory and lethal concentrations were also determined in this study. The microplate method was also used to evaluate the effect of essential oil on biofilm formation inhibition.

3. Results

The results of microbial susceptibility to Satureja essential oil showed that the highest diameter of 30 mm growth inhibition zone was related to the effect of Satureja essential oil at a concentration of 1 g/mL on the growth of Streptococcus sanguis and Eikenella corrodens. The lowest diameter of 9 mm growth inhibition zone was due to the effect of essential oil of 0.1 g/mL on the growth of Eikenella corrodens. Table 1 presents the results of the evaluation of the median inhibitory concentration and median lethal concentration of the essential oil of the Satureja on the studied bacteria.

The median growth inhibitory concentration and the median growth inhibitory concentration were presented in µg/mL. The results of the microplate dilution test showed that the studied bacteria at higher concentrations of 1.562 mg/mL of Satureja essential oil lost their growth ability but still retain their growth potential at lower concentrations of 0.195 mg/mL of this essential oil.

The results of the biofilm inhibition test showed that the studied bacteria did not form biofilms at concentrations higher than or equal to 12.5 mg/mL, but the biofilms were formed at concentrations below 0.39 mg/mL.

4. Discussion

The present study was carried out to investigate the antibacterial activity of the essential oil of Satureja by disk diffusion and microplate dilution methods. The microplate technique was also used to examine the effect of essential oil on biofilm formation. The results of the disk diffusion method, considering the size of the bacterial growth inhibition zone, showed that pure Satureja essential oil (1 g/mL) had a strong antimicrobial activity compared to essential oil at 0.1 g/mL.

By examining the results of the microplate dilution test, the median concentration of essential oil that could inhibit bacterial growth was 1.562 mg/mL for three bacteria of Enterococcus faecalis, Streptococcus sanguis, and Actinomyces viscose. However, this concentration was 0.39 mg/mL for Eikenella corrodens. These results show that Satureja essential oil has a better inhibitory effect on the growth of Eikenella corrodens than Enterococcus faecalis, Streptococcus sanguis, and Actinomyces viscose.

Table 1. Median inhibitory concentration and median lethal concentration of Satureja essential oil

Microorganism	Median Inhibitory Concentration	Median Killer Concentration
Enterococcus faecalis	562.1	562.1
Streptococcus sanguis	562.1	562.1
Eikenella corrodens	39.0	781.0
Actinomyces viscose	562.1	562.1

Overall, the results of this study showed that the essential oil of Satureja has antibacterial activity and can inhibit the growth of a group of periopathogens, including Enterococcus faecalis, Streptococcus sanguis, Eikenella corrodens, and Actinomyces viscose. It can also inhibit the growth of the mentioned bacteria at a concentration of 1.562 mg/mL and more Satureja essential oil. It also has an inhibitory effect on the biofilm formation of the mentioned bacteria so that at concentrations of 12.5 mg/mL and higher of Satureja essential oil, none of the studied bacteria was able to form a biofilm. Therefore, Satureja, as a natural and effective antibacterial, can have a potential role in reducing the probability of incidence and severity of periodontal diseases.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

The Ethics Committee of the Arak University of Medical Sciences approved this study (Code: IR.ARAKMU.REC.1397.67).

Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Authors' contributions

All authors met the standards of writing criteria based on guidelines of the International Committee of Medical Journal Publishers (ICMJE).

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgements

The authors would like to thank the authorities of Arak University of Medical Sciences for their cooperation in conducting this research.

فعالیت ضدباکتریایی و خصوصیات ضدبیوفیلمی اسانس گیاه مرزه بر باکتری‌های دخیل در بیماری‌های پریودنتال

علی ایران‌پور[۱]، مجتبی بیانی[۲]، محمد ارجمندزادگان[۳]، *افروز نخستین[۴]

۱- دندان‌پزشک، اراک، ایران.
۲- گروه پریودانتیکس، دانشکده دندان‌پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران.
۳- مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی، گروه میکروب‌شناسی و ایمنی‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران.
۴- گروه دندان‌پزشکی ترمیمی و زیبایی، دانشکده دندان‌پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران.

اطلاعات مقاله:
تاریخ دریافت: ۲۰ اردیبهشت ۱۳۹۸
تاریخ پذیرش: ۱۶ شهریور ۱۳۹۸
تاریخ انتشار: ۰۹ مهر ۱۳۹۸

چکیده

زمینه و هدف بیماری‌های پریودنتال، از شایع‌ترین بیماری‌های عفونی انسان است که عامل ایجادکننده آن‌ها میکروب‌های دهانی است. گسترش بیوفیلم دهان باعث بروز بیماری‌های مختلف، از جمله التهاب لثه و پریودنتیت می‌شود. گیاه مرزه شامل گونه‌های مختلفی است که اغلب معطر هستند. از گونه‌های مرزه به طور سنتی برای درمان بیماری‌های مختلفی استفاده می‌شود. این مطالعه آزمایشگاهی به بررسی پتانسیل ضدباکتریایی گیاه مرزه علیه پاتوژن‌های پریودنتال می‌پردازد.

مواد و روش‌ها چهار باکتری انتروکوکوس فکالیس، استرپتوکوکوس سانگوئیس، ایکنلا کورودنس، و اکتیتومایسس ویسکوز در این مطالعه بررسی شد. برای بررسی اثر ضدمیکروبی اسانس، از روش‌های دیسک دیفیوژن و میکروپلیت دایلوشن استفاده شد. همچنین حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی نیز تعیین شد.

ملاحظات اخلاقی این مطالعه با کد اخلاق IR.ARAKMU.REC.1397.67 به تصویب کمیته اخلاق معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک رسید.

یافته‌ها در غلظت ۰/۱ گرم بر میلی‌لیتر از اسانس مرزه، باکتری‌ها به ترتیب از حساس به مقاوم، اکتینومایسس ویسکوز، استرپتوکوکوس سانگوئیس، انتروکوکوس فکالیس و ایکنلا کورودنس بودند. بیشترین تأثیر اسانس مرزه بر رشد باکتری ایکنلا کورودنس بود و به عنوان حساس‌ترین باکتری به اثر کشندگی اسانس مرزه، شناخته شد. نتایج سنجش بیوفیلم نشان داد در غلظت‌های ۱۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و بالاتر از اسانس مرزه هیچ بیوفیلمی تشکیل نشد.

نتیجه‌گیری اسانس مرزه خاصیت ضدمیکروبی دارد و بر رشد و تشکیل بیوفیلم گروهی از پریوپاتوژن‌ها اثر مهاری دارد.

کلیدواژه‌ها:
پاتوژن‌های پریودنتال، گیاه مرزه، اثر ضد باکتریایی، ضد بیوفیلم

مقدمه

پوسیدگی دندان و بیماری‌های پریودنتال از شایع‌ترین بیماری‌های عفونی انسان هستند که باکتری‌های دهان از جمله استافیلوکوک اورئوس، میکروکوکوس، سودوموناس، کاندیدا و غیره عامل ایجاد این دو بیماری هستند [۱]. بنابراین بیماری‌های مرتبط با پلاک، احتمالاً شایع‌ترین بیماری‌های باکتریایی در انسان هستند [۲]. برخی از باکتری‌هایی که نقش آن‌ها در ایجاد بیماری‌های پریودنتال و پوسیدگی دندان مشخص شده است، عبارت‌اند از انتروکوکوس فکالیس[۱] [۳]، استرپتوکوکوس سانگوئیس[۲] [۴]، ایکنلا کورودنس[۳] [۵]، و اکتینومایسس ویسکوز[۴] [۶].

بیوفیلم یک توده متراکم غیرکلسیفیه و ترکیب‌شده با میکروارگانیسم‌ها (به طور عمده استرپتوکوکوس میتیس و استرپتوکوکوس سانگوئیس) است که توسط ماتریسی غنی از پلی‌ساکارید خارج سلولی باکتری‌ها و گلیکوپروتئین بزاقی، به صورتی پایدار و محکم به دندان و دیگر سطوح سخت حفره دهان

1. *Enterococcus Faecalis*
2. Streptococcus Sanguinis
3. Eikenella Corrodens
4. Actinomyces Viscosus

* نویسنده مسئول:
دکتر افروز نخستین
نشانی: اراک، دانشگاه علوم پزشکی اراک، دانشکده دندان‌پزشکی، گروه دندان‌پزشکی ترمیمی و زیبایی.
تلفن: ۳۶۰۲۲۰۸ (۹۱۸) ۹۸+
پست الکترونیکی: afr_na_sa@yahoo.com

متصل می‌شود [۷]. گسترش بیوفیلم باعث بروز بیماری‌های مختلف از جمله پوسیدگی دندان، التهاب لثه و پریودنتیت می‌شود [۸]. درطی بلوغ بیوفیلم دندان، تغییرات گونه‌های باکتریایی به سمت انواع بی‌هوازی و مهاجم‌تر می‌رود که منجر به تجمع پلاک فوق‌لثه‌ای و التهاب لثه شده که نخستین علائم بالینی از بیماری‌های لثه پدیدار می‌شود [۹].

برای پیشگیری و درمان بیماری‌های پریودنتال و پوسیدگی دندان روش‌های مختلفی وجود دارد. یکی از این روش‌ها که برای مدتی طولانی استفاده شده است، حفظ بهداشت دهان و دندان با استفاده از مواد شیمیایی بوده است. دهان‌شویه‌ها اغلب در پیشگیری و درمان عفونت دهان استفاده می‌شده است. دهان‌شویه‌ها ممکن است فلوراید، الکل، دترجانت و سایر مواد ضدمیکروبی داشته باشند [۱۰]. همچنین استفاده از خمیردندان‌ها یکی دیگر از این موارد است. خمیردندان‌ها حاوی فلوراید و دیگر مواد ضدمیکروبی از جمله تریکلوزان و سیترات رویاند، مواد ضدمیکروبی سینتتیک شامل محصولات پوویدون آیوداین، فلورایدها، مشتقات فنل، کلرهگزیدین و ستیل پیریدینیوم هستند [۱۱].

این موارد شیمیایی ممکن است به سلامتی افراد آسیب برسانند. برخی از عوارض ایجادشده توسط این مواد عبارت‌اند از تهوع، اسهال و رنگ‌گرفتن دندان [۱۲]. استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها مانند آمپیسیلین، اریترومایسین، پنیسیلین، تتراسیکلین و وانکومایسین نیز با هدف مهار رشد باکتری، به طور گسترده در دندان‌پزشکی استفاده می‌شوند. امروزه مقاومت به این آنتی‌بیوتیک‌ها و مواد شیمیایی مصنوعی، در جمعیت باکتری‌های دهانی رو به افزایش است [۱۳]. به دلیل نواقص آنتی‌بیوتیک‌ها و مواد شیمیایی، درحال حاضر مواد گیاهی و دیگر مواد ضدباکتری طبیعی به عنوان روش‌های ضدباکتریایی مفید و جایگزین برای شست‌وشوی دهان و خمیر دندان، در معرض توجه‌اند. [۱۴].

گیاه مرزه

جنس مرزه[5] از تیره نعناعیان، اغلب در مناطق مدیترانه‌ای پراکندگی دارد. بررسی ترکیبات سازنده گیاه مرزه در مطالعات مختلف نشان داده است که این گیاه خواص آنتی‌بیوتیکی دارد. گروه‌های عامل و ساختارهایی که باعث این خاصیت گیاه مرزه شده‌اند، در مطالعات مختلف بررسی شده است. بین تمامی ساختارهای گیاه مرزه مشخص شده است که کارواکرول و تیمول به عنوان اجزای اصلی سازنده اسانس مهم‌ترین نقش را در خاصیت ضدباکتریایی این گیاه دارد [۱۵]. در برخی از مطالعات اثر اسانس گیاه مرزه بر برخی از باکتری‌های دهانی بررسی شده است [۱۶، ۱۷].

از آنجا که محیط دهان، حاوی گونه‌های باکتریال متعددی است و در ضمن استفاده از داروهای شیمیایی در حفره دهان با عوارضی از جمله تغییر در فلور طبیعی همراه است، ما بر آن شدیم تا در یک مطالعه آزمایشگاهی، خواص ضدباکتریایی احتمالی اسانس گیاه مرزه با غلظت‌های مختلف را روی تعدادی از میکروارگانیسم‌های شایع دهان بررسی کنیم، چراکه استفاده از داروهای گیاهی همیشه با اثرات جانبی کمتری همراه بوده و در ضمن با توجه به محدودیت مطالعات قبلی در خصوص اثر اسانس گیاه مرزه بر باکتری‌های انتروکوکوس فکالیس، استرپتوکوکوس سانگوئیس، ایکنلا کورودنس و اکتینومایسیس ویسکوز، می‌توان با نتایج حاصل از این مطالعه گامی مثبت در تکمیل خصوصیات ضدباکتریایی این گیاه برداشت.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر از نوع مطالعات تجربی آزمایشگاهی[6] بر روی سویه‌های میکروبی خریداری‌شده از بانک میکروبی ایران شامل انتروکوکوس فکالیس[7]، استرپتوکوکوس سانگوئیس[8]، ایکنلا کورودنس[9] و اکتینومایسس ویسکوز[10]، پس از دریافت مجوز از دانشگاه و در آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه علوم پزشکی اراک انجام شد.

گیاه مرزه به صورت تازه از مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه شهید بهشتی[11] تهیه و به صورت سنتی چند بار با آب شست‌وشو داده شد و سپس در محلی تاریک و به دور از نور خورشید در دمای ۲±۲۴ درجه سانتی‌گراد طی چند روز خشک و سپس آسیاب شد. اسانس‌گیری به روش تقطیر با آب و یا استفاده از دستگاه کلونجر انجام شد.

برای انجام آزمون حساسیت میکروبی به اسانس، با روش دیسک دیفیوژن بعد از تهیه سوسپانسیون میکروبی با غلظت نیم مک فارلند، کشت سوسپانسیون به صورت سفرهای روی محیط کشت مولر- هینتون آگار انجام شد. دیسک بلانک آغشته به ۲۰ میکرولیتر اسانس با غلظت‌های ۱ گرم بر میلی‌لیتر و ۰/۱ گرم بر میلی‌لیتر روی محیط کشت و در فاصله مناسب با دیواره پلیت قرار داده شد. پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و پس از سپری‌کردن دوره انکوباسیون قطر هاله رشدنکردن باکتری بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری و ثبت شد. این آزمایش سه مرتبه تکرار شد و میانگین نتایج گزارش شد.

برای تعیین حساسیت میکروبی به روش میکروپلیت دایلوشن

5. Satureja

6. Field study
7. PTCC1774
8. PTCC 1449
9. PTCC1391
10. PTCC1202
11. Voucher NO: TARI 83144

ابتدا از باکتری‌هایی که از قبل کشت داده شده بودند و از زمان کشت آن‌ها ۲۴-۱۸ساعت گذشته بود، سوسپانسیون تهیه و در محیط کشت مولر- هینتون براث به کدورت نیم مک فارلند رسانده شد. سپس محتویات وارد میکروپلیت (۹۶ خانه‌ای، شامل ۸ ردیف در ۱۲ ستون) شدند، به این صورت که ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری در ردیف اول (که از قبل برای باکتری مدنظر نام‌گذاری شده بود) تا چاهک شماره ۱۱ ریخته شد و ۱۰۰ میکرولیتر از میکروامولسیون اسانس مرزه با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، در چاهک اول به آن اضافه شد. سپس عمل مخلوط‌کردن انجام شد و مجدداً ۱۰۰ میکرولیتر از این چاهک برداشته و به چاهک دوم اضافه شد. این روند به صورت سریالی تا چاهک شماره ۱۰ ادامه پیدا کرد (سریال دایلوشن). به چاهک شماره ۱۱ که کنترل مثبت است، اسانس اضافه نشد. چاهک شماره ۱۲ که کنترل منفی است، فقط حاوی محیط کشت (بدون باکتری) بود. سپس میکروپلیت به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از گذشت ۴۸ ساعت، برای دستیابی به حداقل غلظت مهارکنندگی[12]، چگالی نوری[13] محتویات میکروپلیت با دستگاه الایزاریدر Stat Fax ۳۲۰۰ ساخت کشور آمریکا، در طول موج ۵۴۵ نانومتر، خوانده شد. هرچه عدد چگالی نوری بزرگ‌تر بود به معنای کدورت بیشتر و درنتیجه رشد باکتری بیشتر بود، به این ترتیب، غلظتی از اسانس که بلافاصله بعد از آن چگالی نوری به طور ناگهانی افزایش پیدا کرد (نشان‌دهنده رشد باکتری)، به عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی در نظر گرفته شد. همچنین برای تعیین حداقل غلظت کشندگی[14] از روش رنگ استفاده شد. به این صورت که مقدار ده میکرولیتر رنگ آماده‌شده[15] به تمام چاهک‌ها اضافه شد. بعد از ۴۰ دقیقه انکوباسیون چاهک‌هایی که باکتری در آن‌ها زنده بود، رنگ را احیا و تولید رنگ بنفش کردند و چاهک‌هایی که باکتری در آن‌ها از بین رفته بودند، بدون تغییر باقی ماندند. به این ترتیب چاهک قبل از اولین چاهک بنفش رنگ حداقل غلظت کشندگی بود.

برای تست سنجش مهار تشکیل بیوفیلم بررسی تشکیل و قدرت چسبندگی بیوفیلم در میکروپلیت و ارزیابی کنترل تشکیل بیوفیلم در غلظت‌های مختلف از اسانس ماده گیاهی مورد استفاده انجام شد. مراحل انجام این تست عبارت بودند از ۱- باکتری‌ها به مدت ۱۸ الی ۲۴ ساعت در محیط کشت مولر- هینتون آگار کشت داده شدند؛ ۲- از کلونی‌های تک و یکسان سه کلونی برداشته شد و در مقداری محیط براث[16] کشت داده شد؛ ۳- پس از سه ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، کدورت سوسپانسیون به نیم مک فارلند رسانده شد؛ ۴- ابتدا به تمام چاهک‌های موردمطالعه در میکروپلیت، به مقدار ۱۷۰ میکرولیتر محیط کشت براث اضافه شد. سپس ۲۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری، تا چاهک شماره ۱۱ به آن اضافه شد. سپس به مقدار ۱۰ میکرولیتر از اسانس به چاهک‌ها تا شماره ۱۰ اضافه شد (قبل از اضافه‌کردن اسانس به چاهک‌ها، اسانس با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ۱۰ بار رقیق‌سازی شده بود). در این آزمایش همانند آزمایش قبلی چاهک شماره ۱۱ کنترل مثبت و شماره ۱۲ کنترل منفی بود؛ ۵- میکروپلیت به مدت ۴۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد؛ ۶- پس از گذشت ۴۸ ساعت، محتویات چاهک‌ها به آرامی خارج شد و دو مرتبه با آب مقطر استریل شست‌وشو داده شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر رنگ کریستال ویوله ۰/۱ درصد در چاهک‌ها ریخته و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد؛ ۷- رنگ به‌آرامی با سمپلر خالی شد و سپس چاهک‌ها دو مرتبه با آب مقطر استریل شست‌وشو داده شدند. درنهایت به‌آرامی روی دستمال کاغذی ضربه زده شد تا آب چاهک‌ها خالی شود؛ ۸ اجازه داده شد چاهک‌ها در دمای اتاق خشک شوند و سپس برای ارزیابی نسبی تشکیل بیوفیلم ۲۰۰ میکرولیتر اتانول ۹۵ درصد برای حل شدن رنگ مرتبط با سطح به چاهک‌ها زده و به مدت ۱۰ الی ۱۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد؛ ۹- محتویات هر چاهک را مخلوط کرده و سپس چگالی نوری ۱۲۵ میکرولیتر از این محلول در طول موج ۵۴۵ نانومتر توسط دستگاه الایزاریدر اندازه‌گیری شد. هر چه میزان چگالی نوری بیشتر باشد، یعنی کدورت بیشتر بوده و درنتیجه باکتری بیوفیلم بیشتری تشکیل داده است.

یافته‌ها

قطر هاله‌های رشدنکردن مربوط به غلظت‌های مختلف اسانس مرزه در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. نتایج این جدول نشان می‌دهد بیشترین قطر هاله رشدنکردن ۳۰ میلی‌متر است که مربوط به تأثیر اسانس مرزه با غلظت ۱ گرم بر میلی‌لیتر، بر رشد دو باکتری استرپتوکوکوس سانگوئیس و ایکنلا کورودنس بود. کمترین قطر هاله رشدنکردن ۹ میلی‌متر گزارش شد که مربوط به اثر اسانس مرزه با غلظت ۰/۱ گرم بر میلی‌لیتر، بر رشد باکتری ایکنلا کورودنس بود. تصویر شماره ۱ نمونه‌ای از هاله رشدنکردن باکتری اکتینومایسس ویسکوزیس در اطراف دیسک دیفیوژن با غلظت ۱ گرم بر میلی‌لیتر اسانس گیاه مرزه است.

همچنین مقادیر حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی اسانس گیاه مرزه در جدول شماره ۲ نشان داده شده است. میزان چگالی نوری در آزمایش میکروپلیت دایلوشن مربوط به غلظت‌های مختلف اسانس مرزه در جدول شماره ۳ نشان داده شده است. نتایج این تست نشان داد همه باکتری‌ها تا چاهک شماره ۶، یعنی تا غلظت ۱/۵۶۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از اسانس مرزه، رشد نکرده‌اند، به عبارت دیگر می‌توان گفت باکتری‌ها در غلظت‌های بیشتر و مساوی ۱/۵۶۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از

12. Minimum inhibitory concentration
13. Optical density
14. Minimum bactericidal concentration
15. Tetrazolium-based
16. Brain heart infusion broth

جدول ۱. قطر هاله‌های رشدنکردن بر حسب میلی‌متر مربوط به غلظت‌های مختلف اسانس مرزه

نام میکروارگانیسم	غلظت ۰/۱ گرم بر میلی‌لیتر	غلظت ۱ گرم بر میلی‌لیتر
انتروکوکوس فکالیس	۱۳	۲۴
استرپتوکوکوس سانگوئیس	۱۵	۳۰
ایکنلا کورودنس	۹	۳۰
اکتینومایسس ویسکوز	۱۸	۲۸

جدول ۲. حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی اسانس گیاه مرزه(بر حسب µg/ml)

نام میکروارگانیسم	حداقل غلظت مهارکنندگی	حداقل غلظت کشندگی
انتروکوکوس فکالیس	۱/۵۶۲	۱/۵۶۲
استرپتوکوکوس سانگوئیس	۱/۵۶۲	۱/۵۶۲
ایکنلا کورودنس	۰/۳۹	۰/۷۸۱
اکتینومایسس ویسکوز	۱/۵۶۲	۱/۵۶۲

اسانس مرزه، توانایی رشد خود را از دست داده‌اند. همچنین همه باکتری‌ها از چاهک شماره ۹ به بعد رشد کرده‌اند، یعنی باکتری‌ها در غلظت‌های پایین‌تر و مساوی ۰/۱۹۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از اسانس مرزه، همچنان توانایی رشد خود را حفظ کرده‌اند.

میزان چگالی نوری در آزمایش مهار تشکیل بیوفیلم مربوط به غلظت‌های مختلف اسانس مرزه در جدول شماره ۴ نشان داده شده است. نتایج این آزمایش نشان می‌دهد که همه باکتری‌ها از چاهک ۳ به قبل، یعنی در غلظت‌های بیشتر و مساوی ۱۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از اسانس مرزه، بیوفیلم تشکیل ندادند. همچنین همه باکتری‌ها، از چاهک ۸ به بعد، یعنی غلظت‌های کمتر از ۰/۳۹ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از اسانس، بیوفیلم تشکیل داده‌اند.

بحث

پژوهش حاضر برای بررسی فعالیت ضدباکتریایی اسانس گیاه مرزه و با استفاده از روش‌های دیسک دیفیوژن و میکروپلیت دایلوشن انجام شد. همچنین برای بررسی اثر اسانس بر تشکیل بیوفیلم، از تکنیک میکروپلیت بهره برده شد. نتایج حاصل از روش دیسک دیفیوژن، با توجه به اندازه قطر هاله رشدنکردن باکتری، نشان داد اسانس مرزه خالص (غلظت ۱ گرم بر میلی‌لیتر)، نسبت به اسانس با غلظت ۰/۱ گرم بر میلی‌لیتر، خاصیت ضدمیکروبی قوی‌تری دارد. اسانس خالص بیشترین اثر مهاری را بر رشد استرپتوکوکوس سانگوئیس و ایکنلا کورودنس، به طور یکسان

جدول ۳. میزان چگالی نوری در آزمایش میکروپلیت دایلوشن مربوط به غلظت‌های مختلف اسانس مرزه

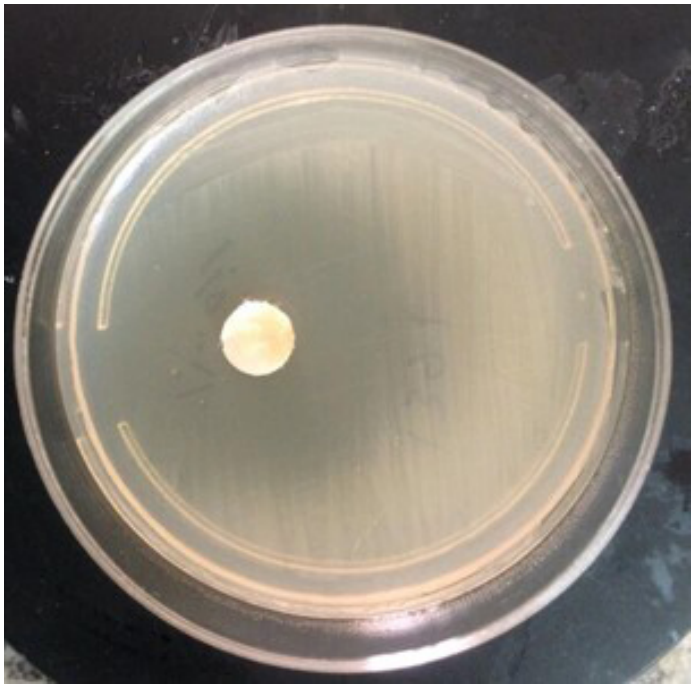
میکروارگانیسم	غلظت‌های مختلف مرزه بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر										
	۵۰	۲۵	۱۲/۵	۶/۲۵	۳/۱۲۵	۱/۵۶۲	۰/۷۸۱	۰/۳۹	۰/۱۹۵	۰/۰۹۷	شاهد مثبت	شاهد منفی
انتروکوکوس فکالیس	۰/۱۱۰	۰/۱۱۵	۰/۱۱۰	۰/۱۱۷	۰/۱۲۰	۰/۱۱۳	۰/۳۲۸	۰/۳۳۰	۰/۳۶۵	۰/۳۳۴	۰/۴۳۶	۰/۰۸۵
استرپتوکوکوس سانگوئیس	۰/۱۰۱	۰/۱۰۷	۰/۱۱۲	۰/۱۱۵	۰/۱۲۵	۰/۱۱۰	۰/۱۴۰	۰/۱۶۲	۰/۲۴۰	۰/۲۸۵	۰/۴۳۶	۰/۰۷۷
ایکنلا کورودنس	۰/۱۱۵	۰/۱۲۰	۰/۱۱۸	۰/۱۱۰	۰/۱۱۶	۰/۱۲۰	۰/۱۴۶	۰/۱۶۲	۰/۲۰۸	۰/۲۲۱	۰/۳۴۵	۰/۰۹۵
اکتینومایسس ویسکوز	۰/۰۹۸	۰/۱۰۱	۰/۱۱۰	۰/۱۰۸	۰/۱۰۶	۰/۱۱۱	۰/۲۷۲	۰/۲۶۳	۰/۲۹۴	۰/۲۷۳	۰/۳۲۵	۰/۰۹۰

جدول ۴. میزان چگالی نوری در آزمایش مهار تشکیل بیوفیلم مربوط به غلظت‌های مختلف اسانس مرزه

میکروارگانیسم	غلظت‌های مختلف مرزه بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر										
	۵۰	۲۵	۱۲/۵	۶/۲۵	۳/۱۲۵	۱/۵۶۲	۰/۷۸۱	۰/۳۹	۰/۱۹۵	۰/۰۹۷	شاهد مثبت	شاهد منفی
انتروکوکوس فکالیس	۰/۱۰۸	۰/۱۰۱	۰/۱۱۳	۰/۸۵۳	۰/۸۹۵	۰/۹۵۲	۰/۹۵۵	۰/۸۵۶	۱/۰۴۴	۱/۱۲	۱/۱۸	۰/۰۵۴
استرپتوکوکوس سانگوئیس	۰/۸۳	۰/۰۹۴	۰/۰۸۵	۰/۱۱۲	۰/۱۲۸	۰/۱۴	۰/۱۳۹	۰/۱۳	۱/۰۵۸	۱/۰۵۶	۱/۰۸۸	۰/۰۵۲
ایکنلا کورودنس	۰/۰۹	۰/۰۸۷	۰/۱۰۳	۰/۰۶۸	۰/۳۱۲	۰/۸۳۹	۰/۹۸۱	۱/۰۴۱	۰/۹۹۹	۱/۰۳۳	۱/۴۶۳	۰/۰۸
اکتینومایسس ویسکوز	۰/۰۷۹	۰/۰۸۹	۰/۱۱۸	۰/۱	۰/۰۹۴	۰/۰۹۲	۰/۱۰۳	۰/۸۶۳	۱/۰۰۹	۱/۱۸۸	۱/۲۵۳	۰/۰۹۱

و پس از آن به‌ترتیب، بر اکتینومایسس ویسکوز و انتروکوکوس فکالیس داشت. نتایج روش دیسک دیفیوژن برای اسانس با غلظت ۰/۱ گرم بر میلی‌لیتر نسبت به نتایج گفته‌شده، کمی متفاوت بود. به این صورت که باکتری‌ها به ترتیب حساسیت به اسانس، اکتینومایسس ویسکوز، استرپتوکوکوس سانگوئیس، انتروکوکوس فکالیس و ایکنلا کورودنس بودند.

با بررسی نتایج به‌دست‌آمده از آزمایش میکروپلیت دایلوشن، حداقل غلظتی از اسانس که می‌تواند از رشد باکتری ممانعت کند، برای سه باکتری انتروکوکوس فکالیس، استرپتوکوکوس سانگوئیس و اکتینومایسس ویسکوز میزان ۱/۵۶۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. در صورتی که این غلظت برای باکتری ایکنلا کورودنس برابر با ۰/۳۹ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. این نتایج نشان می‌دهد اسانس مرزه، بر رشد ایکنلا کورودنس نسبت به انتروکوکوس فکالیس، استرپتوکوکوس سانگوئیس و اکتینومایسس ویسکوز اثر مهاری بهتری بروز داده و در غلظت‌های کمتری مانع رشد آن شده است. درنهایت می‌توان گفت اسانس مرزه توانسته در غلظت‌های ۱/۵۶۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و بیشتر، مانع از رشد تمام باکتری‌های مذکور شود. طبق نتایج حداقل غلظت کشندگی نیز همانند نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی، حساس‌ترین باکتری نسبت به سه باکتری دیگر ایکنلا کورودنس بود. یافته‌ها در تست سنجش مهار تشکیل



تصویر ۱. هاله رشدنکردن باکتری اکتینومایسس ویسکوزیس در اطراف دیسک دیفیوژن با غلظت ۱ گرم بر میلی‌لیتر اسانس گیاه مرزه

بیوفیلم ثابت کرد که در غلظت‌های ۱۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و بیشتر از اسانس مرزه هیچ یک از باکتری‌های مطالعه‌شده قادر به تشکیل بیوفیلم نبودند. بیشترین اثر مهار تشکیل بیوفیلم، بر باکتری اکتینومایسس ویسکوز بود که در غلظت‌های ۰/۳۹ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و بیشتر، اسانس مرزه قادر به تشکیل بیوفیلم نبود. از طرفی ضعیف‌ترین اثر مهاری اسانس بر تشکیل بیوفیلم باکتری انتروکوکوس فکالیس بود.

نتایج مطالعه حاضر با برخی از یافته‌های سایر مطالعات همخوانی دارد. در مطالعه‌ای که اثر ضدمیکروبی اسانس گیاه مرزه به‌تنهایی و در ترکیب با نیسین را بر اشریشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس بررسی کرد، مشخص شد اثر مهاری اسانس مرزه بر رشد استافیلوکوکوس اورئوس قوی‌تر از این اثر بر رشد اشریشیاکلی است. در این مطالعه، همچنین نتایج این پژوهش نشان داد اسانس مرزه اثرات ضدمیکروبی‌ای دارد که این اثر بر باکتری‌های گرم منفی، نسبت به باکتری‌های گرم مثبت، بیشتر است [۱۶].

نتایج حاصل از پژوهش ما نیز، نشان‌دهنده فعالیت ضدمیکروبی اسانس گیاه مرزه بود. با توجه به اینکه باکتری‌های بررسی‌شده در این مطالعه با مطالعه ما متفاوت بود، می‌توان گفت اسانس مرزه بر رشد طیف وسیع‌تری از باکتری‌ها اثر مهاری دارد. در مطالعه دیگری اثرات ضدباکتری و ضد قارچ اسانس گیاه مرزه و آویشن بر جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس بررسی شد. در این مطالعه مشخص شد اسانس‌های مرزه و آویشن اثرات سمی حتی تا حداقل غلظت کشندگی ده برابر نشان ندادند، بنابراین به نظر می‌رسد مواد مناسبی برای جلوگیری از تشکیل بیوفیلم هستند [۱۷]. هرچند نتایج این مطالعه از نظر نوع باکتری و روش کار متفاوت بود، از نظر اثر گیاه مرزه بر باکتری، با نتایج مطالعه ما همخوان بود.

در مطالعه دیگری که زمردیان و همکاران انجام دادند، اثر آنتی‌میکروبیال اسانس هفت گیاه معطر ایرانی شامل مرزه خوزستانی، مرزه تابستانی، ریحان مقدس، درمنه، آویشن شیرازی، زنیان رومی و لعل کوهستانی بر برخی از عوامل شایع عفونت‌های دهانی بررسی شد. باکتری‌هایی که در این مطالعه بررسی شدند عبارت‌اند از: استرپتوکوکوس موتانس، استرپتوکوکوس سانگوئیس، استرپتوکوکوس سالیواریوس، استرپتوکوکوس سابرینوس، انتروکوکوس فکالیس، استافیلوکوکوس اورئوس و کاندیدا آلبیکنز. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد اسانس‌های مورد آزمایش، رشد پاتوژن‌های دهانی بررسی‌شده را مهار کردند. در میان پاتوژن‌های مورد بررسی دهان، انتروکوکوس فکالیس بیشترین سطح حداقل کشندگی و حداقل مهارکنندگی را داشت. به عبارت دیگر این باکتری مقاوم‌ترین سویه در برابر اسانس شناخته شد. در حالی که در مطالعه ما انتروکوک فکالیس، استرپتوکوکوس سانگوئیس و اکتینومایسس ویسکوز از نظر حساسیت به اسانس در یک سطح قرار داشتند. از اسانس‌های بررسی‌شده، مرزه خوزستانی، آویشن شیرازی و مرزه تابستانی، بیشترین میزان فعالیت ضدمیکروبی را نشان دادند که این نتایج یافته‌های مطالعه ما را تأیید می‌کند.

در مطالعه دیگری اثرات ضدمیکروبی اسانس اکالیپتوس، زیره سبز و مرزه تابستانی بر استرپتوکوکوس موتانس بررسی شده است. نتایج این مطالعه نشان داد هر سه اسانس دارای اثر ضدباکتریایی در برابر استرپتوکوک موتانس هستند. اسانس مرزه در مقایسه با دو اساس دیگر قوی‌ترین اثر ضد باکتریایی را در همه زمان‌های قرارگرفتن در معرض اسانس و در تمام غلظت‌ها نشان داد. این مطالعه نیز با وجود تفاوت در گونه باکتری، تأییدی بر یافته‌های مطالعه ماست [۱۸].

در مطالعه دیگری که کرمانشاه و همکاران انجام دادند، اثر عصاره هیدروالکلی هفت گیاه مریم گلی، انیسون، مرزه تابستانی، سماق، زیره، پونه و بومادران بر میکروارگانیسم‌های استرپتوکوکوس موتانس، لاکتوباسیلوس رامنوسوس، و اکتینومایسس ویسکوز که از باکتری‌های پوسیدگیزا هستند، در شرایط آزمایشگاهی بررسی شد. نتایج این مطالعه نیز نشان داد عصاره مرزه بر رشد باکتری اکتینومایسس ویسکوز اثر مهاری دارد که با مطالعه ما همخوان بود [۱۹].

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد اسانس گیاه مرزه خاصیت ضدباکتریایی دارد و توانایی مهار رشد گروهی از پریوپاتوژن‌ها شامل انتروکوک فکالیس، استرپتوکوکوس سانگوئیس، ایکنلا کورودنس و اکتینومایسس ویسکوز را دارد. همچنین می‌تواند در غلظت ۱/۵۶۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و بیشتر از رشد باکتری‌های ذکرشده ممانعت به عمل آورد. این اسانس همچنین بر تشکیل بیوفیلم باکتری‌های نام‌برده اثر مهاری دارد، به طوری که در غلظت‌های ۱۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و بیشتر از اسانس مرزه، هیچ‌کدام از باکتری‌های مطالعه‌شده قادر به تشکیل بیوفیلم نبودند. بنابراین می‌توان گفت گیاه مرزه به عنوان یک آنتی‌باکتریال طبیعی و مؤثر، می‌تواند کاربرد احتمالی در کاهش بروز و شدت بیماری‌های پریودنتال داشته باشد.

در مطالعه حاضر چالش‌هایی نیز وجود داشت که عبارت‌اند از کم‌بودن انواع سویه‌های باکتری مطالعه‌شده، کم‌بودن انواع گیاهان دارویی مطالعه، مطالعه‌نشدن در شرایط in vivo و نبود معیار مشخص برای مقایسه اثرات گیاه مرزه با آن، حساسیت تکنیکی مطالعه، سخت‌بودن کشت‌دادن تعدادی از پریوپاتوژن‌های اساسی از جمله پورفیرومونواس ژینژیوالیس. با وجود این محدودیت‌ها نتایج این مطالعه گواه خوبی بر اثر ضدباکتریایی اسانس گیاه مرزه است و پیشنهاد می‌شود برای پی‌بردن به اثر این اسانس در شرایط غیرآزمایشگاهی، مطالعات کارآزمایی بالینی بر روی

نمونه‌های انسانی انجام شود.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این مطالعه با کد اخلاق IR.ARAKMU.REC.1397.67 به تصویب کمیته اخلاق معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک رسید.

حامی مالی

این تحقیق هیچ کمک مالی خاصی از سازمان‌های تأمین مالی در بخش‌های دولتی، تجاری یا غیرانتفاعی دریافت نکرده است.

مشارکت نویسندگان

تمامی نویسندگان معیارهای استاندارد نویسندگی بر اساس پیشنهادهای کمیته بین‌المللی ناشران مجلات پزشکی (ICMJE) را داشتند.

تعارض منافع

نویسندگان تصریح می‌کنند هیچ‌گونه تضاد منافعی در خصوص پژوهش حاضر وجود ندارد.

تشکر و قدردانی

از همکاری‌های دانشگاه علوم پزشکی اراک در انجام این پژوهش تشکر و قدردانی می‌شود.

References

[1] Lasserre JF, Brecx MC, Toma S. Oral microbes, biofilms and their role in periodontal and peri-implant diseases. Mater. 2018; 11(10):pii: E1802. [DOI:10.3390/ma11101802] [PMID] [PMCID]

[2] Murakami S, Mealey BL, Mariotti A, Chapple ILC. Dental plaque-induced gingival conditions. J Periodontol. 2018; 89(Suppl. 1):S17-s27. [DOI:10.1002/JPER.17-0095] [PMID]

[3] Komiyama EY, Lepesqueur LS, Yassuda CG, Samaranayake LP, Parahitiyawa NB, Balducci I, et al. Enterococcus species in the oral cavity: Prevalence, virulence factors and antimicrobial susceptibility. PLOS One. 2016; 11(9):e0163001. [DOI:10.1371/journal.pone.0163001] [PMID] [PMCID]

[4] Zhu B, Macleod LC, Kitten T, Xu P. Streptococcus sanguinis biofilm formation & interaction with oral pathogens. Future Microbiol. 2018; 13:915-32. [DOI:10.2217/fmb-2018-0043] [PMID] [PMCID]

[5] Kim JH, Choi IA. Periodontal pathogens and the association between periodontitis and rheumatoid arthritis in Korean adults. J Periodontal Implant sci. 2018; 48(6):347-59. [DOI:10.5051/jpis.2018.48.6.347] [PMID] [PMCID]

[6] Li J, Li Y, Zhou Y, Wang C, Wu B. Actinomyces and alimentary tract diseases: A review of its biological functions and pathology. Biomed Res Int. 2018; 2018(3820215):1-8. [DOI:10.1155/2018/3820215] [PMID] [PMCID]

[7] Jamal M, Ahmad W, Andleeb S, Jalil F, Imran M, Nawaz MA, et al. Bacterial biofilm and associated infections. J Chin Med Assoc. 2018; 81(1):7-11. [DOI:10.1016/j.jcma.2017.07.012] [PMID]

[8] Velsko IM, Fellows Yates JA, Aron F, Hagan RW, Frantz LAF, Loe L, et al. Microbial differences between dental plaque and historic dental calculus are related to oral biofilm maturation stage. Microbiome. 2019; 7(1):102. [DOI:10.1186/s40168-019-0717-3] [PMID] [PMCID]

[9] Chinsembu KC. Plants and other natural products used in the management of oral infections and improvement of oral health. Acta Tropica. 2016; 154:6-18. [DOI:10.1016/j.actatropica.2015.10.019] [PMID]

[10] Magaz VR, Llovera BF, Marti M, Garre A. Clinical impact and cosmetic acceptability of chlorhexidine-enriched toothpaste and mouthwash application on periodontal disease: A randomized clinical study. J Contemp Dent Pract. 2018; 19(11):1295-300. [DOI:10.5005/jp-journals-10024-2421] [PMID]

[11] Hosadurga R, Boloor VA, Rao SN, MeghRani N. Effectiveness of two different herbal toothpaste formulations in the reduction of plaque and gingival inflammation in patients with established gingivitis - A randomized controlled trial. J Tradit Complement Med. 2018; 8(1):113-9. [DOI:10.1016/j.jtcme.2017.04.005] [PMID] [PMCID]

[12] Yousefimanesh H, Amin M, Robati M, Goodarzi H, Otoufi M. Comparison of the antibacterial properties of three mouthwashes containing chlorhexidine against oral microbial plaques: An in vitro study. Jundishapur J Microbiol. 2015; 8(2):e17341. [DOI:10.5812/jjm.17341] [PMID] [PMCID]

[13] Kanwar I, Sah AK, Suresh PK. Biofilm-mediated antibiotic-resistant oral bacterial infections: Mechanism and combat strategies. Curr Pharm Des. 2017; 23(14):2084-95. [DOI:10.2174/1381612822666161124554549] [PMID]

[14] Sadrnia M, Habibi G, Arjomandzadegan M. [Comparison of disk diffusion and micro-dilution broth methods for evaluation of antimicrobial effects of myrtus extract on methicillin-resistant staphylococcus aureus and escherichia coli ESBL (Persian)]. J Arak Uni Med Sci. 2018; 21(3):75-82.

[15] Serrano C, Matos O, Teixeira B, Ramos C, Neng N, Nogueira J, et al. Antioxidant and antimicrobial activity of Satureja montana L. extracts. J Sci Food Agric. 2011; 91(9):1554-60. [DOI:10.1002/jsfa.4347] [PMID]

[16] Babaei S, Moradi A, Hosseinikia M, Zaveleh OM, Amiri Z, Sohrabi N. [Evaluation of the antimicrobial effects of satureja montana essential oil alone and in combination with nisin on escherichia coli and staphylococcus aureus (Persian)]. J Res Med Dent Sci. 2018; 6(2):54-60.

[17] Sharifi A, Mohammadzadeh A, Zahraei Salehi T, Mahmoodi P. Antibacterial, antibiofilm and antiquorum sensing effects of Thymus daenensis and Satureja hortensis essential oils against Staphylococcus aureus isolates. J Appl Microbiol. 2018; 124(2):379-88. [DOI:10.1111/jam.13639] [PMID]

[18] Zomorodian K, Ghadiri P, Saharkhiz MJ, Moein MR, Mehriar P, Bahrani F, et al. Antimicrobial activity of seven essential oils from Iranian aromatic plants against common causes of oral infections. Jundishapur J Microbiol. 2015; 8(2):e17766. [DOI:10.5812/jjm.17766] [PMCID]

[19] Kermanshah H, Kamangar S, Arami S, Kamalinegad M, Karimi M, Mirsalehian A, et al. The effect of hydro alcoholic extract of seven plants on cariogenic bacteria-an in vitro evaluation. Oral Health Dent Manag. 2014; 13(2):395-401. [PMID]

This Page Intentionally Left Blank