

Determining Antibacterial Activity of 19 Medicinal Plant Extracts on Standard and Clinical Strains of *Pseudomonas aeruginosa* and Synergistic Activity of the Most Active Extract with Ceftazidime

Atefeh Salari, Zahra Zahir Nia, Shahla Mansouri*

Microbiology and Virology Department, Faculty of Medicine, Kerman University of Medical Sciences

(Received:2018/06/17

Accept: 2019/02/20)

Abstract

Background: The emergence of multidrug-resistant (MDR) strains of *P. aeruginosa* has become a serious concern today. This bacterium is resistant to a wide range of antimicrobial drugs. There are several ways to treat and control infections caused by MDR bacteria. One of these methods is to find active plant compounds with antimicrobial properties and antimicrobial combination of herbal plants with antibacterial agent with synergistic effects. The aim of the present study was to investigate the antimicrobial effects of 19 aqueous, ethanolic, and methanolic extracts of medicinal plants on standard and MDR strains of *P. aeruginosa*. At the end, the synergistic effect of the most active plant extract with ceftazidime was evaluated.

Methods: Antimicrobial activity of medicinal plants was investigated using agar dilution method on five ceftazidime sensitive and 20 MDR clinical isolates of *P. aeruginosa* resistance to ceftazidime with an MIC range of 64-1024 µg/ml. After determining the best extract, its antimicrobial effect with ceftazidime was investigated by agar dilution using checkerboard assay.

Results: Methanolic and ethanolic extracts of *Quercus infectoria* with concentration of 1000 µg/ml inhibits the growth of all standard and clinical strains of *P. aeruginosa*. The water extract of *Quercus infectoria* and methanolic and ethanolic extract of *Eucalyptus galbica* and *Myrtus communis* also reduced the growth at this concentration but did not inhibit the growth completely. The results showed that the synergistic effects of methanolic extract of *Quercus infectoria* and ceftazidime were significant and the MIC of the drug decreased from 1024 µg/ml to 4 µg/ml, and also the MIC of the extract was reduced to four folds of MIC.

Conclusion: It was shown that the most effective extracts against *Pseudomonas aeruginosa* are methanolic and ethanolic extracts of *Quercus infectoria*, which have significant synergistic effects with ceftazidime.

Keywords: *P. aeruginosa*; *Quercus infectoria*; Synergism; Ceftazidime

* Corresponding Author: Shahla Mansouri
Email: smansouri@kmu.ac.ir

بررسی آثار ضد میکروبی ۱۹ گیاه دارویی بر سویه‌های استاندارد و بالینی پسودوموناس آئروژینوزا و اثر سینرژیسم موثرترین عصاره با آنتی بیوتیک سفتازیدیم

عاطفه سالاری، زهرا ظهیر نیا، شهلا منصوری*

گروه میکروبیولوژی و ویروس‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۷/۱۲/۰۱

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۷/۰۳/۲۷

چکیده:

سابقه و هدف: تظاهرات سویه‌های مقاوم به چند دارو MDR پسودوموناس آئروژنز امروزه به یک نگرانی جدی تبدیل شده است. این باکتری به طیف وسیعی از داروهای ضد میکروبی مقاوم است. روش‌های مختلفی برای درمان و کنترل عفونت ناشی از باکتری‌های MDR وجود دارد. یکی از این روش‌ها پیدا کردن ترکیب‌های فعال گیاهی است که با ترکیب داروهای ضد میکروبی دارای آثار سینرژیسم با یکدیگر باشند. هدف از مطالعه حاضر، بررسی اثر ضد میکروبی عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی ۱۹ گیاه دارویی روی سویه‌های استاندارد و همچنین سویه‌های بالینی مقاوم به چند دارو (MDR) پسودوموناس آئروژینوزا است. در نهایت اثر سینرژیسم بهترین عصاره با آنتی بیوتیک سفتازیدیم بررسی شد.

مواد و روش‌ها: فعالیت ضد میکروبی گیاهان دارویی به روش رقت در آگار برای پنج سویه استاندارد پسودوموناس آئروژنز حساس به سفتازیدیم و ۲۰ سویه کلینیکی MDR و MIC بین ۶۴ تا ۱۰۲۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر بررسی شد و بعد از تعیین موثرترین عصاره اثر ضد میکروبی آن با آنتی بیوتیک سفتازیدیم به روش چکربرد در آگار بررسی شد.

نتایج: عصاره متانولی و اتانولی گیاه مازو با غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر قادر به مهار از رشد تمام سویه‌های استاندارد و بالینی پسودوموناس آئروژینوزا بود. عصاره آبی مازو و عصاره متانولی و اتانولی مورد و اکالیپتوس نیز در این غلظت سبب کاهش از رشد باکتری شدند، ولی ممانعت کامل از رشد دیده نشد. آثار سینرژیسم بین عصاره متانولی مازو و سفتازیدیم بسیار قابل ملاحظه بوده و MIC دارو از ۱۰۲۴ $\mu\text{g/ml}$ به ۴ $\mu\text{g/ml}$ تنزل داشته و همچنین عصاره نیز به میزان چهار برابر کاهش MIC داشته است.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد موثرترین عصاره علیه پسودوموناس آئروژینوزا، عصاره متانولی و اتانولی مازو بوده و آثار سینرژیسم بارزی با سفتازیدیم دارد.

واژگان کلیدی: پسودوموناس آئروژینوزا، گیاه مازو، سینرژیسم، سفتازیدیم

مقدمه:

هوازی رشد کرده و در نبود اکسیژن نیز می‌تواند با استفاده از نیتрат به جای اکسیژن به صورت بی‌هوازی رشد کند. این باکتری توسط فاکتورهای مختلف ویبولانس سبب ایجاد بیماری می‌شود؛ بنابراین به عنوان باکتری مشکل‌ساز در درمان، در سراسر جهان شناخته شده است (۳). پسودوموناس آئروژینوزا به طور ذاتی به بسیاری از آنتی بیوتیک‌ها مقاوم است که دلیل آن می‌تواند نفوذپذیری پایین غشای خارجی باکتری، وجود پمپ‌های برون‌ریز (efflux pump) و ترشح آنزیم‌هایی باشد که سبب غیرفعال کردن عوامل ضد میکروبی می‌شود. همچنین این باکتری با انتقال افقی می‌تواند ژن‌های مقاومت را کسب کند (۴). ظهور سویه‌های MDR1 پسودوموناس آئروژینوزا امروزه به یک نگرانی جدی تبدیل شده است به دلیل اینکه

گسترش بیماری‌های میکروبی مقاوم به دارو یکی از جدی‌ترین تهدیدها برای درمان موفقیت‌آمیز بیماری‌های عفونی است (۱). پسودوموناس آئروژینوزا باکتری گرم منفی، غیر تخمیری، متحرک و فرصت‌طلب است که می‌تواند عفونت‌های بیمارستانی، عفونت‌های مجاری ادراری، عفونت‌های دستگاه گوارش، کراتیت، اوتیت و باکتری می‌را در بیماران با نقص سیستم ایمنی ایجاد کرده و سبب مرگ و میر قابل ملاحظه در بیماران عفونی شود. در حال حاضر پسودوموناس آئروژینوزا نقش برجسته‌ای را در عفونت‌های بیمارستانی در سراسر جهان ایفا می‌کند به طوری که این باکتری را مسئول ۱۰ تا ۱۵ درصد عفونت‌های بیمارستانی در جهان می‌دانند (۲). پسودوموناس آئروژینوزا در بسیاری از محیط‌ها یافت شده، در شرایط

نویسنده مسئول: دکتر شهلا منصوری
smansouri@kmu.ac.ir
پست الکترونیک:

ضد میکروبی گیاهی با شیمیایی که دارای آثار سینرژیسم با یکدیگر باشند (۸). مطالعه‌های مختلفی آثار سینژیک ترکیب آنتی‌بیوتیک‌ها را با عصاره‌های خام گیاهی علیه باکتری‌ها گزارش کرده‌اند (۶، ۸).

هدف از این مطالعه، تعیین اثر ضد میکروبی عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی ۱۹ گیاه که در طب سنتی آثار ضد میکروبی داشته‌اند (۱۰، ۹) روی سویه‌های استاندارد و بالینی پseudomonas aeruginosa و بررسی اثر سینرژیسم بهترین عصاره با آنتی‌بیوتیک سفتازیدیم است.

مواد و روش‌ها:

گیاهان استفاده شده در این بررسی یا به صورت تازه از مناطق مختلف ایران جمع‌آوری یا از عطاری‌های معتبر سطح شهر خریداری شدند. در هر مورد گیاهان توسط مرکز تحقیقات داروهای گیاهی در دانشکده داروسازی شناسایی شده و از هر گیاه یک نمونه تأیید شده در این مرکز ذخیره شد.

۱. تهیه عصاره آبی، متانولی و اتانولی گیاهان: عصاره ۱۹ گیاه مختلف (جدول شماره ۱) به روش خیسندن تهیه شد. برای تهیه عصاره ۲۰ گرم از پودر هر گیاه به طور مجزا در حلال اتانول (متانول Merck آلمان) یا آب اضافه شد و سپس به مدت ۲۴ ساعت در حلال خیسانده و در تاریکی قرار داده شد. سپس عصاره‌ها صاف شدند و در حرارت آزمایشگاه قرار گرفتند تا خشک شوند و تا زمان انجام آزمایش در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (۱۱).

۲. سویه‌های میکروبی استفاده شده: سویه‌های میکروبی که در این مطالعه استفاده شد شامل پنج سویه استاندارد pseudomonas aeruginosa شامل PAO.wild، ATCC27853، PDO 300 (mucA2e)، PAO1 (MH873) و MS.50/30 بود که تماماً به سفتازیدیم حساس بودند و میزان حداقل غلظت ممانعت‌کننده از رشد در برابر سفتازیدیم (شرکت جابرین حیان، ایران) برای ایزوله‌ها بین یک تا چهار میکروگرم

این باکتری به طیف وسیعی از داروهای ضد میکروبی مقاوم بوده و همین مسئله سبب افزایش هزینه‌های بیمارستانی می‌شود (۵). عفونت‌های مقاوم، سبب افزایش میزان مرگ‌ومیر و هزینه‌های درمانی شده و گسترش بیماری و طول مدت درمان را تحت تأثیر قرار می‌دهند (۶). مطالعه‌های متعددی افزایش مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها را در pseudomonas aeruginosa اثبات کرده است (۱). میزان مقاومت نسبت به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها در این باکتری به شدت بالا رفته، به خصوص در کشورهای در حال توسعه روندها به صورت افزایشی است. با وجود این واقعیت که بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌های جدید به طور صنعتی سنتز می‌شوند کنترل بیماری‌های عفونی به طور جدی به وسیله افزایش مداوم میکروارگانیسم‌های مقاوم در برابر داروهای ضدمیکروبی شیمیایی تهدید می‌شود. چنین حقیقتی سبب نگرانی شدید است چرا که سویه‌های مقاوم به چند دارو (MDR: Multiple Drug Resistant) باکتریایی جدید توسعه می‌یابند. این مسائل و مشکلات نیاز فوری به استراتژی‌های جدید و یافتن داروهای ضد میکروبی جدید را نشان می‌دهد (۶). ترکیب‌های مشتق شده از گیاهان می‌توانند سبب یافتن داروهای ضدمیکروبی جدید با سمیت کمتر، طیف گسترده‌تر و فارماکوکینتیک مناسب شوند و شاید بتوان از این داروها بدون تغییر شیمیایی استفاده کرد. بنابراین گیاهانی که در مقدار کم دارای آثار ضد میکروبی باشند باید برای تشخیص خواص درمانی، ایمنی و کارایی بررسی شوند (۶). از دیرباز تاکنون، گیاهان به واسطه خواص دارویی موجود در ترکیب‌های آن‌ها، به طور گسترده در طب سنتی و پزشکی نوین استفاده می‌شوند. به نظر می‌رسد آثار جانبی گیاهان در برابر آنتی‌بیوتیک‌های صنعتی کمتر باشد و به همین دلیل گیاهان دارویی از محبوبیت زیادی برای درمان عفونت‌های باکتریایی برخوردارند (۷). روش‌های مختلفی برای برای درمان و کنترل عفونت ناشی از باکتری‌های MDR وجود دارد؛ مانند جداسازی ترکیب‌های فعال گیاهی با خواص ضد میکروبی و ترکیب داروهای

جدول ۱: نام علمی، خانواده و قسمت استفاده شده گیاهان در این بررسی

نام گیاه	نام علمی	قسمت مورد بررسی	خانواده
رزماری	<i>Rosmarinus officinalis</i>	سرشاخه هوایی	Lamiaceae
مورد	<i>Myrtus communis</i>	برگ	Myrtaceae
مازو	<i>Quercus infectoria</i>	گال	Fagaceae
اکالیپتوس	<i>Eucalyptus galbie</i>	برگ	Myrtaceae
نعنا	<i>Mentha piperita</i>	برگ	Lamiaceae
چینسینگ	<i>Panax ginseng</i>	ریشه	Aralioideae
هلیله سیاه	<i>Terminalia chebulla</i>	میوه	Combretaceae
آویشن	<i>Zataria multiflora</i>	سرشاخه هوایی	Lamiaceae
میخک	<i>Sizigium aromaticus</i>	سرشاخه هوایی	Caryophyllaceae
چای کوهی	<i>Hypericum perforayum</i>	سرشاخه هوایی	Hypericaceae
آلوئه ورا	<i>Aloe vera</i>	صمغ	Aloaceae
کندر	<i>Boswellia sacra</i>	صمغ	Burseraceae
سنجد	<i>Elaeagnus angustifolia</i>	میوه	Elaeagnaceae
سیاه دانه	<i>Nigella sativa</i>	دانه	Ranunculaceae
سرخار گل	<i>Echinacea angustifolia</i>	سرشاخه هوایی	Assteraceae
رازیانه	<i>Foeniculum vulgare</i>	میوه	Apiaceae
گزرنه	<i>Urtica dioica</i>	سرشاخه هوایی	Urticaceae
شیرین بیان	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	سرشاخه هوایی	Fabaceae
برگ بو	<i>Laurus nobilis</i>	برگ	Lauraceae

FICI=MICAB/ MICA+MICAB/MICB

MIC AB: حداقل غلظت بازدارندگی از رشد باکتری در ترکیب آنتی بیوتیک و عصاره

MIC A: حداقل غلظت بازدارندگی آنتی بیوتیک از رشد باکتری به تنهایی

MIC B: حداقل غلظت بازدارندگی از رشد باکتری در برابر عصاره به تنهایی

بر اساس عدد حاصل از محاسبه شاخص کسری FICI، میانگین آنتی بیوتیک و عصاره به صورت زیر تفسیر شد: آثار سینرژیسم: FICI < 0.5؛ آثار افزایشی FICI > 1؛ بی تفاوت: 0.5 < FICI < 1 و آثار آنتاگونیسم: FICI > 4 (۱۳).

بر ارزیابی واکنش سینرژیسم بین عصاره و آنتی بیوتیک برای سویه های بالینی: برای ارزیابی واکنش سینرژیسم بین عصاره و آنتی بیوتیک روش چکربورد در آگار به کار گرفته شد. از محیط مولر هیتون آگار (Himedia, India) استفاده شد. بعد از اتوکلاو محیط مولر هیتون آگار در شرایط کاملاً استریل عصاره و آنتی بیوتیک به محیطی که به حرارت ۵۵ درجه سانتی گراد رسیده بود به محیط اضافه کرده و پس از سرد شدن و اطمینان از خشک بودن سطح محیط (نبود رطوبت در سطح پلئیت) استفاده شدند. از کشت خالص هریک از سویه ها کدورت نیم مک فارلند تهیه و باکتری در سرم فیزیولوژی استریل ۱۰۰ برابر رقیق شد. تلقیح سویه های باکتری با استفاده از (Mast Chemical Company, England) hand inoculator انجام شد. پلئیت ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه و پس از یک شبانه روز از نظر رشد باکتری بررسی شدند. شاخص FICI برای پلئیت هایی که در آن رشد مشاهده نمی شد، محاسبه شد.

یافته ها:

حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC) عصاره ها به روش رقت در آگار در این مطالعه غلظت های دوهزار و یک هزار و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر برای بررسی اثر ضد میکروبی عصاره ها بر سویه های استاندارد پseudomonas آئروژینوزا به کار گرفته شد. از بین ۵۷ عصاره آبی، اتانولی و متانولی ۱۹ گیاه بررسی شده، عصاره متانولی و اتانولی مازو دارای بیشترین اثر ضد میکروبی روی سویه های مطالعه شده بود. در این مطالعه بعد از تعیین MIC به روش رقت در آگار مشخص شد که عصاره متانولی و اتانولی مازو در غلظت ۱۰۰۰ μg/ml قادر به مهار رشد تمام سویه های استاندارد و بالینی پseudomonas آئروژینوزا است. به طوری که MIC عصاره متانولی و اتانولی مازو برای تمام ایزوله ها هزار میکروگرم بر میلی لیتر بود. عصاره آبی مازو و عصاره متانولی و اتانولی مورد و اکالیپتوس نیز در غلظت های هزار و دوهزار میکروگرم بر میلی لیتر سبب کاهش رشد باکتری در سطح محیط گشت در مقایسه با کنترل شدند، ولی رشد نیافتگی دیده نشد.

حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC) آنتی بیوتیک سفنازیدیم

حداقل غلظت مهارکننده از رشد آنتی بیوتیک سفنازیدیم برای سویه های پseudomonas آئروژینوزا بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر تعیین شد. نتایج حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC) آنتی بیوتیک سفنازیدیم علیه سویه های استاندارد بین یک تا چهار میکروگرم بر میلی لیتر بود که نشان دهنده حساسیت تمامی سویه های استاندارد نسبت به آنتی بیوتیک مزبور بود، در حالی که میزان MIC90 و MIC50 و میانگین MIC نسبت به سفنازیدیم در ایزوله های بالینی به ترتیب برابر با ۱۰۲۴ و ۵۱۲ و ۶۹۴/۴ میکروگرم بر میلی لیتر بود.

واکنش سینرژیسم بین عصاره و آنتی بیوتیک در سویه های استاندارد
برای بررسی میانگین بین آنتی بیوتیک سفنازیدیم و عصاره مازو علیه سویه های استاندارد پseudomonas آئروژینوزا، روش Checker Board در برات به کار گرفته شد. پس از ترکیب کردن آنتی بیوتیک ها و عصاره در غلظت های انتخابی میزان FICI محاسبه و تفسیر شد. نتیجه این مطالعه نبود واکنش سینرژیسم بین آنتی بیوتیک سفنازیدیم و عصاره متانولی مازو بود. در این مطالعه چهار سویه استاندارد واکنش بی تفاوتی را نشان دادند اما در سویه MS.PS ۳۰/۵۰ که حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد بالاتر از سایر ایزوله (چهار میکروگرم بر میلی لیتر) واکنش افزایشی مشاهده شد.

واکنش سینرژیسم بین عصاره و آنتی بیوتیک در سویه های بالینی

برای بررسی میانگین بین آنتی بیوتیک سفنازیدیم و غلظت های Sub MIC

بر میلی لیتر بود. علاوه بر آن ۲۰ ایزوله پseudomonas آئروژینوزا با MIC بین که تماماً نسبت به آنتی بیوتیک های ایمی پنم، سفنازیدیم، جنتامایسین، سیپروفلوکساسین، پیمپراسیلین و کاربنی سیلین مقاوم بودند و در بخش میکروبی شناسی دانشکده پزشکی افضلی پور کرمان شناسایی شده و اثر ضد میکروبی آن ها تأیید شده بود، بررسی شدند.

۳. تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC) عصاره ها به روش آگار دایلوئن: ابتدا عصاره ها در DMSO حل شد و سپس مقدار معینی از محلول های تهیه شده به محیط های مولر هیتون آگار اضافه شد و غلظت های ۲۰۰۰ و ۱۰۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره تهیه شد. محیط های حاوی هریک از عصاره ها در داخل پلئیت های استریل پخش شد. سوسپانسیون میکروبی نمونه های بررسی شده با کدورت معادل کدورت استاندارد نیم مک فارلند تهیه و به نسبت ۱:۱۰۰ رقیق شد و سپس ۱۰ میکرولیتر به روی محیط کشت حاوی عصاره تلقیح شد. بعد از خشک شدن پلئیت ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. به عنوان کنترل مثبت در پلئیتی که فقط حاوی محیط مولر هیتون آگار است به میزان مساوی باکتری تلقیح کردیم. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی گراد نتایج بررسی شدند (۱۲). برای هر رقت باکتری سه پلئیت در نظر گرفته شد.

۴. تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC) آنتی بیوتیک: آنتی بیوتیک توسط روش میکروبراث دایلوئن در پلئیت های ۹۶ خانه ای (Falcon, USA) تعیین شد. ابتدا رقت های سریالی از آنتی بیوتیک در محیط مولر هیتون براث تهیه شد. از کشت تازه هر سویه باکتریایی، سوسپانسیونی معادل ۰.۵ مک فارلند تهیه و به نسبت ۱:۱۰۰ رقیق شد. سپس به هر چاهک ۱۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون باکتریایی و ۴۰ میکرولیتر محیط کشت تلقیح شد تا حجم نهایی هر چاهک به ۱۰۰ میکرولیتر رسید. چاهک شماره ۱۱ به عنوان کنترل منفی برای کنترل آلودگی نشدن محیط و چاهک شماره ۱۲ به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. سپس میکروپلئیت های آماده سازی شده به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد برای تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد بررسی شدند. وجود کدورت دلالت بر رشد باکتری دارد و اولین چاهکی که در آن رشد مشاهده نمی شد به عنوان حداقل غلظت مهارتی در نظر گرفته شد. آزمایش به صورت سه بار تکرار انجام شد (۱۲).

۵. ارزیابی واکنش سینرژیسم بین عصاره و آنتی بیوتیک برای سویه های استاندارد: برای ارزیابی واکنش سینرژیسم بین عصاره و آنتی بیوتیک روش چکربورد در برات به کار گرفته شد. ابتدا طیفی از غلظت ها با توجه به MIC سویه ها تعیین گ و سه، چهار غلظت بالاتر از MIC و چهار، پنج غلظت پایین تر از MIC برای آنتی بیوتیک و عصاره در نظر گرفته شد. غلظت های آنتی بیوتیک و عصاره تعیین شده در ویال های حاوی محیط مولر هیتون براث تهیه شد. بنابراین هفت ویال برای آنتی بیوتیک و هفت ویال برای عصاره آماده شد. در شرایط کاملاً استریل غلظت های آنتی بیوتیک به صورت افقی و غلظت های عصاره به صورت عمودی در چاهک ها ریخته شد. از هریک از غلظت های آنتی بیوتیک و عصاره مقدار ۲۵ میکرولیتر در چاهک مربوطه ریخته شد، به طوری که حجم محلول در هر چاهک به ۵۰ میکرولیتر رسید. در ستون یک و ردیف هشت که به ترتیب عصاره و آنتی بیوتیک به صورت منفرد وجود داشت، ۲۵ میکرولیتر محیط مولر هیتون براث اضافه شد تا حجم آن ها همانند بقیه چاهک ها ۵۰ میکرولیتر شود. ستون ۱۲ به عنوان کنترل مثبت و چاهک آخر ستون اول برای کنترل آلودگی نشدن محیط در نظر گرفته شد. از کشت خالص هریک از سویه ها کدورت نیم مک فارلند تهیه شد و در لوله های حاوی محیط مولر هیتون براث سوسپانسیون باکتری ۱۰۰ برابر رقیق شد. ۱۰ میکرولیتر از محیط مولر هیتون براث حاوی باکتری و ۴۰ میکرولیتر محیط مولر هیتون براث در تمامی چاهک های میکروپلئیت ها پخش شد. برای هر سویه باکتری یک میکروپلئیت ۹۶ خانه ای استفاده شد. میکروپلئیت ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد و پس از یک شبانه روز از نظر رشد باکتری بررسی شدند. کدورت شاخصی بر رشد باکتری بود. شاخص FICI برای اولین چاهکی که در آن رشد مشاهده نمی شد، محاسبه شد.

FICI = FIC (عصاره) + FIC (سفنازیدیم: B)

نتایج این یافته‌ها با مطالعه ما مطابقت دارد و در مطالعه ما نیز بازدهی عصاره‌های متانولی و اتانولی در مقایسه با عصاره‌های آبی بیشتر بود و همچنین عصاره‌های متانولی و اتانولی اثر ضد میکروبی بهتری در مقایسه با عصاره‌های آبی داشتند. Veeramuthu و همکاران فعالیت ضد میکروبی عصاره متانولی و هگزانی ۱۸ گیاه دارویی را علیه سویه‌های باکتریایی باسیلوس سوبتیلیس، استافیلوکوک اورئوس، استافیلوکوک اپیدرمیدیس، پseudomonas آئروژینوزا، انتروکوک فکالیس، اشریشیا کلی، کلبسیلا پنومونیه و پروتئوس و لگاریس بررسی کردند که از بین این ۱۸ گیاه، ۱۰ گیاه فعالیت ضد میکروبی خوبی را علیه این باکتری‌ها نشان دادند (۱۹). نتایج مطالعه ما نشان داد از بین ۱۹ گیاه دارویی شامل عصاره‌های آبی، متانولی و اتانولی بررسی شده در این طرح عصاره متانولی و اتانولی مازو دارای بیشترین اثر ضد میکروبی روی سویه‌های بالینی و استاندارد pseudomonas آئروژینوزا بودند و در غلظت ۲ هزار و هزار میکروگرم بر میلی‌لیتر از رشد تمامی باکتری‌های بررسی شده جلوگیری کردند. به طوری که MIC عصاره متانولی و اتانولی مازو برای تمام ایزوله‌ها هزار میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. عصاره آبی مازو و عصاره متانولی و اتانولی مورد و اکالپتوس نیز در این دو غلظت سبب کاهش رشد باکتری شده، ولی ممانعت کامل از رشد دیده نشد. مازو با نام علمی Quercus infectoria جزو گیاهان تیره Fagaceae است. Quercus infectoria درخت کوچکی است که در بسیاری از نقاط دنیا از جمله یونان، آسیای میانه، سوریه و ایران رشد می‌کند (۲۰). گال‌هایی که روی شاخه‌های جوان این درخت به وجود می‌آیند، در نتیجه حمله زنبور هستند. گال‌های مازو برای قرن‌ها در داروهای سنتی شرقی برای درمان بیماری‌های التهابی استفاده می‌شد و از نظر فارماکولوژیکی ثابت شده که دارای اثر ضد درد، ضد ترمورین، بیهوشی موضعی، ضد ویروسی، ضد باکتریایی و ضد قارچی هستند و فعالیت ضد التهابی دارند (۲۱). در ترکیب‌های مازو ۵۰ تا ۷۰ درصد تانن و مقدار کمی اسید گالیک و اسید الاجیک وجود داشته و به نظر می‌رسد خصوصیات ضد میکروبی گال‌های مازو به دلیل مقدار بالای تانن موجود در آن‌هاست (۲۲، ۲۳). مطالعه‌های زیادی نشان داده‌اند که عصاره‌های گیاهی علیه باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از باکتری‌های گرم منفی فعالیت دارند. دلیل اصلی این تفاوت در حساسیت باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی در برابر عصاره گیاهان می‌تواند به دلیل غشای خارجی احاطه‌کننده دیواره سلولی در باکتری‌های گرم منفی باشد که مانع انتشار ترکیب‌ها از طریق پوشش لیپوپلی ساکارید می‌شود. همچنین فضای پری پلاسمیک حاوی آنزیم‌هایی است که قادر به شکستن مولکول‌هایی هستند که از خارج وارد می‌شوند (۲۴، ۲۳). در مطالعه ما نیز بیشتر عصاره‌ها بر روی pseudomonas آئروژینوزا که یک باکتری گرم منفی است اثر ضد میکروبی اندکی داشتند در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۱ Kashi و همکاران تایید کردند که تفاوت در فعالیت ضد میکروبی عصاره‌ها می‌تواند به خاطر تفاوت در ترکیب شیمیایی آن‌ها باشد. زمان جمع‌آوری نمونه‌ها، نمونه‌های جمع‌آوری شده از نواحی جغرافیایی متفاوت با اقلیم و پوشش گیاهی متفاوت، فعالیت ضد میکروبی متفاوتی را نیز از خود نشان می‌دهند (۲۵). در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۴ بر روی گال‌های مازو و ایزوله‌های باکتریایی جدا شده از عفونت‌های سوختگی انجام شد، نشان داده شد که تفاوت در نتایج بررسی آثار مازو با مطالعه‌های دیگر به دلیل تفاوت در نوع گال‌ها، مدت عصاره‌گیری و فرآیند خشک شدن عصاره‌هاست (۲۲). در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۰ Adwan و همکاران فعالیت ضد میکروبی تعدادی عصاره گیاهی را به تنهایی و در ترکیب با آنتی‌بیوتیک‌های اکسی تتراسایکلین، انروفلوکساسین و جنتامایسین علیه سویه‌های MDR pseudomonas آئروژینوزا بررسی کردند. نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره اتانولی گیاه Rhus coriaria فعالیت ضد میکروبی بیشتری را بر سویه‌های pseudomonas آئروژینوزا به تنهایی و در ترکیب با آنتی‌بیوتیک‌ها دارد (۲۶). در مطالعه ما نیز اثر سینرژیستی بین آنتی‌بیوتیک سفنازیدیم و عصاره متانولی و اتانولی مازو علیه سویه‌های استاندارد و بالینی pseudomonas آئروژینوزا به روش چکربورد در برات مشاهده نشد. در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۰ Bag و همکاران، آثار سینرژیسم عصاره گیاه Terminilia chebula و آنتی‌بیوتیک‌های آموکسی سیلین، سفنازیدیم، سیپروفلوکساسین، جنتامایسین و توبرامایسین را علیه هشت

عصاره متانولی مازو علیه سویه‌های بالینی pseudomonas آئروژینوزای بررسی شده از روش رقت در آگار استفاده شد. پس از ترکیب کردن آنتی‌بیوتیک‌ها و عصاره در غلظت‌های انتخابی میزان FICI برای سویه‌های بررسی شده محاسبه و تفسیر شد. بررسی نشان داد که ترکیب غلظت‌های ۵۰۰ و ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره متانولی مازو و غلظت‌های ۱۶ و هشت و چهار میکروگرم بر میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک سفنازیدیم واکنش سینرژیسم وجود دارد اما در غلظت‌های ۱۲۵ و ۶۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره مازو هیچ واکنش سینرژیسمی مشاهده نشد (جدول شماره ۲). جدول ۲: میزان FICI برای آنتی‌بیوتیک سفنازیدیم و عصاره مازو و FICI در ترکیب آنتی‌بیوتیک سفنازیدیم و عصاره متانولی مازو در سویه‌های استاندارد و بالینی pseudomonas آئروژینوزا. در تمام موارد FICI بوده و میانگین بین آنتی‌بیوتیک و سفنازیدیم سینرژیسم است.

FICI	FICI عصاره	FICI آنتی‌بیوتیک	شماره ایزوله‌ها
۰/۲۶	۰/۲۵	۰/۰۱۵	۱
۰/۲۶	۰/۲۵	۰/۰۱۵	۲
۰/۲۶	۰/۲۵	۰/۰۱۵	۳
۰/۲۶	۰/۲۵	۰/۰۱۵	۴
۰/۲۶	۰/۲۵	۰/۰۱۵	۵
۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۰۰۸	۶
۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۰۰۸	۷
۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۰۰۸	۸
۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۰۰۸	۹
۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۰۰۸	۱۰
۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۰۰۸	۱۱
۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۰۰۴	۱۲
۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۰۰۱	۱۳
۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۰۰۸	۱۴
۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۰۰۴	۱۵
۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۰۰۴	۱۶
۰/۳۱	۰/۲۵	۰/۰۶۲	۱۷
۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۰۰۸	۱۸
۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۰۰۴	۱۹
۰/۲۶	۰/۲۵	۰/۰۱۵	۲۰

بحث:

امروزه pseudomonas آئروژینوزا نقش مهمی را در عفونت‌های بیمارستانی ایفا می‌کند و به دلیل مقاومت به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها عفونت به وسیله آن به عنوان یک مشکل شناخته می‌شود. در مطالعه‌های متعددی نشان داده شده که عصاره‌های متانولی گیاهان دارای آثار مهارکنندگی بیشتری نسبت به عصاره‌های دیگر هستند. به دلیل اینکه اجزای فعال قسمت‌های گیاه با متانول در مقایسه با حلال‌های دیگر مانند آب و پترولیوم اتر حلال‌های بهتر هستند (۱۷، ۱۶، ۱۵، ۱۴). در مطالعه شریفی‌فر و همکاران نشان داده شد عصاره اتانولی برگ‌های مازو فعالیت ضد میکروبی بیشتری در مقایسه با عصاره آبی آن دارد که شاید به دلیل ترکیب‌های آلی متنوعی است که می‌تواند بیشتر در این قبیل حلال‌ها از صافی عبور کنند (۱۸).

وجود داشت (۳۰). در مطالعه ما اثر سینرژیسمی بین آنتی‌بیوتیک سفنازیدیم و عصاره متانولی مازو روی سویه‌های بالینی تنها با روش رقت در آگار مشاهده شد که دلیل آن نبود حلالیت کامل عصاره در براث یا رسوب عصاره است که مانع واکنش ضد میکروبی می‌شود. میزان MIC₅₀ برای ایزوله‌های بالینی برابر با ۱۲/۵۱۲ µg/ml و MIC₉₀ برابر با ۱۰۲۴ µg/ml بود که نشان‌دهنده این است میزان مقاومت به سفنازیدیم خیلی بالا بود. این بررسی دارای نتایج قابل ملاحظه‌ای است؛ زیرا MIC عصاره گیاهی و آنتی‌بیوتیک سفنازیدیم به شدت کاهش یافته بود. برای مثال؛ در نمونه‌های بالینی MIC نسبت به سفنازیدیم بسیار بالا بود، ولی در مجاورت با عصاره متانولی مازو تمامی MICها به میزان بسیار زیاد کاهش یافته بودند. در نتیجه ترکیب‌های موجود در گیاه مازو و ترکیب‌های موثره این گیاه که سبب کاهش MIC می‌شود نیاز به بررسی بیشتر داشته و دارویی مانند سفنازیدیم می‌تواند با دوز بسیار کمتر استفاده شود.

نتیجه‌گیری:

نتایج این مطالعه نشان دهنده این است که عصاره های گیاهی دارای مواد ضد میکروبی مناسبی است که می‌توان از آن‌ها به عنوان یک پایه دارویی یا یک داروی گیاهی مناسب برای مبارزه با میکروارگانیسم‌هایی از جمله پseudomonas آئروژینوزا استفاده کرد. در این مطالعه نشان داده شد که عصاره متانولی و اتانولی مازو دارای فعالیت ضد میکروبی خوبی روی پseudomonas آئروژینوزاست و آثار سینرژیسم قابل ملاحظه‌ای با سفنازیدیم دارد.

منابع:

- Owlia P, Sadari H, Rasooli I, Sefidkon F. Antimicrobial characteristics of some herbal oils on *Pseudomonas aeruginosa* with special reference to their chemical compositions. *Iranian journal of pharmaceutical research*. 2009;8(2):107–14.
- Strateva T, Yordanov D. *Pseudomonas aeruginosa* - A phenomenon of bacterial resistance. *Journal of medical microbiology*. 2009;58(9):1133–48.
- Musthafa KS, Saroja V, Pandian SK, Ravi AV. Antipathogenic potential of marine *Bacillus* sp. SS4 on N-acyl-homoserine- lactone-mediated virulence factors production in *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1). *Journal of biosciences*. 2011;36(1):55–67.
- Morita Y, Tomida J, Kawamura Y. Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials. *Frontiers in microbiology*. 2014;4(1):1–8.
- Morita Y, Tomida J, Kawamura Y. Primary mechanisms mediating aminoglycoside resistance in the multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate PA7. *Microbiology*. 2018;1(2012):1071–83.
- Nenaah EG, Ahmed ME. Antimicrobial activity of extracts and latex of *Calotropis procera* (Ait.) and synergistic effect with reference antimicrobials. *Research Journal of Medicinal plants*. 2011;5(6):706–16.
- Mahmoudi E, Tarzaban S, Abed A. Acyl homoserine lactone mimic compounds from plants excite quorum sensing related behaviors in *Chromobacterium violaceum* CV026 and *Pectobacterium carotovorum*. *International journal of soil Forest and erosion* 2013 ; 3 (4):141–5.
- Adwan G, Abu-shanab B, Adwan K. In vitro activity of certain drugs in combination with plant extracts against *Staphylococcus aureus* infections. *African journal of biotechnology*. 2009;8(17):4239–41.

ایزوله E-coli یورپاتوژنیک به روش چکربورد در براث بررسی کردند. از بین پنج آنتی‌بیوتیک بررسی شده، آتاسینرژیسیم قوی در ترکیب عصاره گیاه با آنتی‌بیوتیک جنتامایسین و توبرامایسین مشاهده کردند (۲۷). در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۲ توسط Basri و همکاران اثر ضد میکروبی عصاره متانولی و استونی مازو بر سویه‌های استافیلوکوک‌های ارتوس مقاوم به متی‌سیلین MRSA و اثر سینرژیسم آن را با آنتی‌بیوتیک ونکومایسین بررسی کردند. نتایج نشان داد که MIC عصاره متانولی مازو برای سویه ATCC 33591 برابر با ۶۲۵/۰ mg/ml و برای عصاره استونی ۳۱۲/۰ mg/ml بود. MIC برای هر دو عصاره روی سویه MRSA MU945 برابر با ۳۱۲/۰ mg/ml بود و نتایج بررسی سینرژیسم با آنتی‌بیوتیک ونکومایسین نشان داد که عصاره متانولی هشت برابر و عصاره استونی ۱۶ برابر میزان MIC را کاهش دادند که نشان‌دهنده این است که این عصاره می‌تواند در ترکیب با آنتی‌بیوتیک ونکومایسین ساخت دیواره سلولی را مهار کند (۲۸). در مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۹ توسط Chusri و همکاران روی سویه‌های بالینی MRSA استافیلوکوک اورئوس انجام شد، مشاهده شد که عصاره اتانولی مازو دارای توانایی مهار ایزوله‌های MRSA است. در این مطالعه اکثر سویه‌های بالینی، فعالیت سینرژیسمی بین عصاره اتانولی مازو و آنتی‌بیوتیک‌های آموکسی سیلین، اگزاسیلین و پنی‌سیلین G نشان دادند (۲۹). در سال ۲۰۰۹، Abu-Hijleh و همکاران واکنش سینرژیسم بین عصاره اتانولی *Varthemia iphionitiks* و آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم در محیط آگار علیه سویه‌های باسیلوس سوبتیلیس و استافیلوکوک اورئوس نشان دادند. در حالی که در سویه‌های استافیلوکوک اپیدرمیدیس و اشریشیا کلی واکنش آنتاگونیسم

- Wang W, Wu N, Zu YG, Fu YJ. Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to its main components. *Food chemistry*. 2008;108(3):1019–22.
- Mehrotra V, Mehrotra S, Kirar V, Shyam R, Misra K, Srivastava AK,. Antioxidant and antimicrobial activities of aqueous extract of *Withania somnifera* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of microbiology and biotechnology research*. 2017;1(1):40–5.
- Mahboubi A, Kamalinejad M, Ayatollahi AM, Babaeian M. Total phenolic content and antibacterial activity of five plants of Labiateae against four foodborne and some other bacteria. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*, 2014; 13(2): 559–66.
- Andrews JM. Determination of minimum inhibitory concentrations. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2001;48(suppl_1):5–16.
- Olajuyigbe OO, Afolayan AJ. Synergistic interactions of methanolic extract of *Acacia mearnsii* De Wild. with antibiotics against bacteria of clinical relevance. *International journal of molecular sciences*. 2012;13(7):8915–32.
- Natheer SE, Sekar C, Amutharaj P, Rahman MSA, Khan KF. Evaluation of antibacterial activity of *Morinda citrifolia*, *Vitex trifolia* and *Chromolaena odorata*. *African journal of pharmacy and pharmacology*. 2012;6(11):783–8.
- Ahmad W, Zeenat F, Hasan A, Abdullah A, Nargis A, Tarannum T. Mazu (*Quercus infectoria*, Oliv)-An Overview. *Indian J Unani Med*. 2011;4(1):17–22.
- Alo MN, Anyim C, Igwe JC, Elom M, Uchenna DS. Antibacterial activity of water, ethanol and methanol extracts of *Ocimum gratissimum*, *Vernonia amygdalina* and *Aframomum melegueta*. *Advances in Applied Science Research*. 2012;3(2):844–8.
- El-Zawahry YA, Reda FM, Azazy WM. Synergistic effect of

combination treatment by certain plant extracts and some antibiotics on the resistance of pathogenic bacteria to some common antibiotics. Life science journal. 2013;10(4):3477-89.

18. Shariatifar N, Fathabad AE, Khaniki GJ, Nasrabadi HG. Evaluation of the antibacterial activity of essential oil and aqueous and ethanolic extracts of *Quercus infectoria* leaves on food-borne pathogenic bacteria. International journal of pharmaceutical sciences and research. 2014;5(10):709-13.

19. Duraipandiyan V, Ayyanar M, Ignacimuthu S. Antimicrobial activity of some ethnomedicinal plants used by Paliyar tribe from Tamil Nadu, India. BioMed Central Complementary and alternative medicine. 2006;1472-6882/6/35.

20. Kaur G, Hamid H, Ali A, Alam MS, Athar M. Antiinflammatory evaluation of alcoholic extract of galls of *Quercus infectoria*. Journal of ethnopharmacology. 2004;90(2-3):285-92.

21. Umachigi SP, Jayaveera KN, Kumar CKA, Kumar GS, Kumar DVK. Studies on wound healing properties of *Quercus infectoria*. Tropical Journal of Pharmaceutical Research. 2008;7(1):913-9.

22. Karbasizade V, Sichani MM, Chaharmiri S. High antibacterial activity of different extracts of *Ghalghaf* and *Mazouj* galls against bacterial isolates from burn infections. Indian journal of scientific research. 2014;2(1):315-23.

23. Vermani A. Screening of *Quercus infectoria* gall extracts as antibacterial agents against dental pathogens. Indian journal of dental research. 2009;20(3):337-9.

24. Klančnik A, Piskernik S, Jeršek B, Možina SS. Evaluation of

diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. Journal of microbiological methods. 2010;81(2):121-6.

25. Kashi TSJ, Kermanshahi RK, Erfan M, Dastjerdi EV, Rezaei Y, Tabatabaei FS. Evaluating the in-vitro antibacterial effect of Iranian propolis on oral microorganisms. Iranian journal of pharmaceutical research. 2011;10(2):363-8.

26. Adwan G, Abu-Shanab B, Adwan K. Antibacterial activities of some plant extracts alone and in combination with different antimicrobials against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains. Asian Pacific journal of tropical medicine. 2010;3(4):266-9.

27. Bag A, Bhattacharyya SK, Pal NK, Chattopadhyay RR. Synergistic Effect of *Terminalia chebula* and Antibiotics against Multidrug-resistant Uropathogenic *Escherichia coli*. Medicinal and aromatic plant science and biotechnology. 2010;5(1):70-3.

28. Basri DF, Khairon R. Pharmacodynamic interaction of *Quercus infectoria* galls extract in combination with vancomycin against MRSA using microdilution checkerboard and time-kill assay. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2012;2012(1):1-6.

29. Chusri S, Voravuthikunchai SP. Detailed studies on *Quercus infectoria* Olivier (nutgalls) as an alternative treatment for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. Journal of Applied Microbiology. 2009;106(1):89-96.

30. Abu-Hijleh A, Jarrar N, Adwan K. Antibacterial activity of common *Varthemia*, *Varthemia iphionoides* ethanol extract alone and in combination with cefotaxime. Advances in Biological Research. 2009;3(1):144-7.