Research on Medicine Original Article

The Quarterly journal of School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences 2021 ;Vol.45; No.3

Effect of hydro-alcoholic extracts of Rosmarinus officinalis L., Mentha piperita L., and Zataria multiflora Boiss on biofilm formation of Pseudomonas

Tayebeh Hatami Pirghibi[1], Khosrow Chehri*[1], Ramin Abiri[2], Ishaq Karimi[1]

1. Department of Biology, Faculty of Science, Razi University, Kermanshah, Iran

2. Department of Microbiology, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

(Received: 2020/02/3 Accepted: 2020/06/9)

Abstract

***Background**: Medicinal plants are promising therapeutic agents. Antimicrobial agents from plants are compounds that kill microorganisms or stop their growth. The aim of the present study was to determine the effect of hydro-alcoholic extract of Rosmarinus officinalis, Zataria multiflora, and Mentha piperita on biofilm formation of Pseudomonas aeruginosa bacterium.*

***Materials and Methods:** For the purpose of the present experimental study, extracts of these plants were prepared and their effects on P. aeruginosa growth were assessed using disk diffusion technique and the results were compared with disk diffusion results of kanamycin, imipenem, penicillin, and cephalexin. Then, the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and the Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of extracts were determined separately. The effect of these extracts on biofilm formation was assessed via staining with crystal violet %1 and acetic acid %30. All tests were repeated three times and statistical analyses were performed using SPSS, v. 16.*

***Results:** We found that all three plant extracts at the concentration of 3 mg/ml had antimicrobial properties. The diameter of inhibition halos of extracts of R. officinalis, Z. multiflora, and M. piperita were 15 ,19, and 11 mm, respectively. The minimum inhibitory concentration of R. officinalis was 75/0 mg/ml and the minimum inhibitory concentration of Z. multiflora and M. piperita 5/1 mg/ml. Also, the results showed that R. officinalis reduces and inhibits biofilm formation at concentrations of 5/1 and 3 mg/ml, respectively. But, Z. multiflora and M. piperita only reduced biofilm formation at concentration of 3 mg/ml.*

***Conclusion:** It can be concluded that the alcoholic extract of R. officinalis with a concentration of 3 and 1.5 mg/ml is a potent inhibitor against P. aeruginosa biofilm formation.*

***Keywords:** Medicinal plants; Biofilm; Pseudomonas aeruginosa*

** Corosponding author: Khosrow Chehri*

Email: khchehri@gmail.com

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-05-17]

پژوهش در پزشکی
مقاله پژوهشی
فصلنامه علمی پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
دور ۴۵، شماره ۳، ۱۴۰۰، صفحات ۱۱ تا ۱۷

اثر عصاره آبی-الکلی رزماری، آویشن‌شیرازی و نعناع فلفلی بر شکیل بیوفیلم باکتری *سودوموناس آئروژینوزا*

طیبه حاتمی‌پیرغیبی[۱]، خسرو چهری*[۱]، رامین عبیری[۲]، اسحق کریمی[۱]

۱. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران
۲. گروه میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

دریافت: ۱۳۹۸/۹/۱۱ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۱/۲۷

چکیده:

سابقه و هدف: گیاهان دارویی عوامل دارویی نوید بخشی هستند. عوامل ضدمیکروبی استخراج شده از گیاهان، ترکیب‌هایی هستند که میکروارگانیسم‌ها را می‌کشند یا مانع رشد آن‌ها می‌شوند. هدف اصلی از انجام این مطالعه، بررسی اثر عصاره آبی-الکلی گیاهان رزماری، نعناع فلفلی و آویشن شیرازی روی تشکیل بیوفیلم باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* بود.

مواد و روش ها: این مطالعه به صورت تجربی انجام شد. پس از عصاره‌گیری گیاهان مورد مطالعه، به روش نشر در آگار به بررسی اثر این عصاره‌ها بر *سودوموناس آئروژینوزا* پرداخته و نتایج به دست آمده با چهار دیسک آنتی‌بیوتیکی کانامایسین، ایمی‌پنم، پنی‌سیلین و سفالکسین مقایسه شد. سپس حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی را برای هر عصاره گیاهی به طور جداگانه اندازه‌گیری شد. تأثیر این عصاره‌ها بر مهار تشکیل بیوفیلم به کمک رنگ‌آمیزی با کریستال ویوله ۱درصد و استیک‌اسید ۳۰ درصد سنجش شد. تمام آزمون‌ها سه بار تکرار شدند و آنالیزهای آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS ورژن ۱۶ انجام شد.

یافته‌ها: بر اساس نتایج به دست آمده مشخص شد که هر سه گیاه در غلظت ۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر دارای خاصیت ضد باکتریایی بودند. قطر هاله عدم رشد برای عصاره رزماری ۹۱، برای آویشن شیرازی ۵۱ و برای نعناع فلفلی ۱۱ میلی‌متر بود. حداقل غلظت بازدارندگی برای گیاه رزماری ۰/۵۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و برای آویشن شیرازی و نعناع فلفلی ۱/۵میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. همچنین نتایج نشان داد که گیاه رزماری در غلظت ۳ و ۵/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ترتیب سبب مهار و کاهش تشکیل بیوفیلم شد. اما گیاه آویشن شیرازی و نعناع فلفلی در غلظت ۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر فقط سبب کاهش تشکیل بیوفیلم شدند.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسدکه با توجه به یافته‌های بدست آمده از این مطالعه می‌توان نتیجه گرفت که عصاره الکلی گیاه رزماری با غلظت ۳ و ۱/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، توانایی بالایی برای مهار توانایی تشکیل بیوفیلم توسط باکتری*سودوموناس آئروژینوزا* دارد.

واژگان کلیدی: گیاهان دارویی، بیوفیلم، سودوموناس ائروژینوز

مقدمه

در سال‌های اخیر پدیده مقاومت آنتی‌بیوتیکی به عنوان یک مشکل مهم در مراقبت‌های بهداشتی مطرح شده است. این ویژگی، پاتوژن‌های میکروبی مقاوم به آنتی‌بیوتیک را گسترش می‌دهد(۱)بنابراین باید یک جایگزین غیر شیمیایی کارآمد برای آنتی‌بیوتیک‌های شیمیایی بیابیم. گیاهان دارویی شامل انواع مختلفی از مجموعه گیاهان هستند که برخی از آن‌ها دارای فعالیت‌های دارویی‌اند. این گیاهان سرشار از متابولیت‌های ثانویه هستند که برای سنتز و توسعه داروها و نیز درمان بیماری‌های مختلف استفاده می شوند(۲). آویشن شیرازی، رزماری و نعناع فلفلی از خانواده گیاهان Lamiaceae هستند(۳). گیاه رزماری یک گیاه بوته‌ای آروماتیک همیشه سبز است که در بسیاری از مناطق جهان از جمله اروپا، آفریقا و آسیا رشد می‌کند. این گیاه به دلیل ترکیب‌های آروماتیک، ترکیب‌های آنتی‌اکسیدان و ویژگی‌های بیولوژیکی خاص خود در این خانواده بسیار مورد توجه قرار گرفته است. در مطالعه‌های اخیر آثار و فعالیت‌های ضد باکتریایی، ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی رزماری بررسی شده است. نعناع فلفلی یک گیاه علفی و چندساله، با رشد سریع و جنس شناخته شده این خانواده است که شامل ۱۰-۳۰ گونه است که امروزه در سراسر جهان کشت داده می‌شود و یکی از پرکاربردترین گیاهان دارویی به حساب می‌آید. آویشن شیرازی جنس دیگر خانواده Lamiaceae است که در مناطق گرم و کوهستانی ایران، پاکستان و افغانستان رشد می‌کند. آثار متفاوت این گیاه از جمله تاثیر ضد باکتریایی، ضد اسپاسم و ضدالتهابی در مطالعه‌های فراوانی تایید و اثبات شده است(۴، ۵، ۶، ۷ و ۸). *سودوموناس ائروژینوزا* یکی از مهم‌ترین باکتری‌های مقاوم در برابر آنتی‌بیوتیک‌هاست. این باکتری گرم منفی متعلق به خانواده

نویسنده مسئول: خسرو چهری
پست الکترونیک: khchehri@gmail.com

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-05-17]

سودوموناداسه است که در برابر بسیاری از داروهای ضدباکتریایی مقاوم است. تا سال ۲۰۰۳ ، مقاومت این باکتری در برابر ایمی‌پنم ، فلوروکینولون‌ها و نسل سوم سفالوسپورین‌ها بیش از ۳۵درصد اعلام شده است. مقاومت چندگانه به دارو سودوموناس آئروژینوزا در بخش مراقبت‌های ویژه بسیار شایع است و مقاومت به جنتامایسین، کارباپنم سفتازیدیم و سیپروفلوکساتین نیز در این باکتری افزایش یافته است. بنابراین مقاومت چندگانه به دارو در باکتری *سودوموناس ائروژینوزا*، به یک مشکل جهانی تبدیل شده و مشکلات جدی در درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری ایجاد کرده است(۹). برخی از دلایل این مقاومت چند دارویی نفوذپذیری پایین دیواره سلولی، بیان بالای پمپ‌های ایفلاکس و توانایی تشکیل بیوفیلم است(۴، ۹). هدف ازاین مطالعه بررسی تأثیر عصاره‌های هیدروالکلی گیاهان دارویی رزماری و آویشن شیرازی و نعناع فلفلی بر شکل‌گیری بیوفیلم باکتری *سودوموناس ائروژینوزا* از طریق کنترل سیستم ادراک جمعیت و تعیین حداقل غلظت مهاری و حداقل غلظت کشندگی علیه این باکتری است.

مواد و روش ها

این مطالعه به صورت تجربی انجام شد و تمامی مواد شیمیایی استفاده شده در این مطالعه از جمله اتانول، رنگ کریستال ویوله، استیک اسید و آگار از شرکت سیگما آلدریچ (سنت لویس، میسوری، ایالات متحده آمریکا) خریداری شد. استفاده از حیوانات آزمایشگاهی انجام شد.

آماده‌سازی عصاره گیاهان:

نمونه‌های گیاهی رزماری، آویشن شیرازی و نعناع فلفلی از کلکسیون نگه‌داری گیاهان واقع در گروه گیاه‌شناسی دانشگاه رازی کرمانشاه جمع‌آوری و توسط متخصصان گیاه‌شناسی دانشگاه رازی تایید شد. این گیاهان متعلق به خانواده Lamiaceae هستند و قسمت‌های استفاده شده در این مطالعه برگ و ساقه گیاه بود. گیاهان جمع‌آوری شده در هوای آزاد قرار داده شده وخشک شدند. سپس گیاهان خشک شده به وسیله مخلوط‌کن به پودر تبدیل شدند. ۱۰گرم از پودر هر کدام از گیاهان به صورت جداگانه توزین و در ارلن استریل ریخته و به آن ۱۰۰ میلی‌لیتر آب با الکل ۳۰ درصد اضافه شد تا ترکیب‌های محلول در آب و الکل گیاه حل شدند. ارلن حاوی آب و پودر گیاهی به مدت ۴۸ ساعت درون شکر قرار داده شدند تا در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد، حلال اثر خود را اعمال کند، محلول تهیه شده توسط کاغذ واتمن شماره ۱ صاف شد، از دستگاه روتاری در مرحله بعد برای حل شدن بهتر در حلال استفاده شد. در نهایت عصاره‌های گیاه در ظروف استریل ریخته، در دمای -۲۰ درجه سانتی‌گراد برای جلوگیری از اثر نور با پوشش ورق آلومینیوم نگه‌داری شدند. غلظت نهایی سه گیاه مورد نظر پس از عصاره‌گیری ۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد. این عصاره‌گیری با اتانول ۳۰درصد انجام شد.

آماده‌سازی سویه و محیط کشت باکتری مورد مطالعه:

سویه لیوفیلیزه *سودوموناس ائروژینوزا* با شماره ATCC ۲۷۸۵۳از شرکت سینا تشخیص(تهران، ایران) خریداری شد و در شرایط سترون شکسته و با ۲-۱ میلی‌لیتر محیط کشت براث به صورت سوسپانسیون تهیه شد. چند قطره از این سوسپانسیون توسط سرنگ سترون به محیط کشت مولر هینتون آگار منتقل و به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در انکوباتور قرار داده شد، بعد از رشد، پلیت حاوی باکتری در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. از کلونی‌های ذخیره شده در ۴درجه سانتی‌گراد برای انجام ادامه آزمایش‌ها استفاده شد. برای هر بار استفاده از باکتری، کلونی ذخیره شده روی محیط مولرهینتون آگار کشت تازه داده و پس از ۲۴ ساعت، غلظتی برابر استاندارد نیم مک فارلند (۵/۱ × ۱۰۸cfu/ml) آماده شد. برای آماده‌سازی غلظت برابر نیم مک فارلند، مقداری از کلونی در سرم فیزیولوژی حل و از نظر کدورت با محلول استاندارد نیم مک فارلند مقایسه شد. زمانی که این دو محلول از نظر کدورت برابر شدند، سوسپانسیون مناسب باکتری برای ادامه کار آماده شد(۱۰).

بررسی کم‌ترین غلظت ممانعت‌کننده از رشد (□□□) عصاره‌های گیاهی:

ابتدا از کشت ۲۴ ساعته باکتری بر مولرهینتون آگار محلولی از باکتری در مولرهینتون براث به غلظت نیم مک‌فارلند تهیه و درون هر کدام از ۱۰ چاهک اولیه ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت مولرهینتون براث ریخته شد. قبل از اضافه کردن باکتری به چاهک‌های میکروپلیت به چاهک اول میکروپلیت ۵۰ میکرولیتر محیط کشت مولرهینتون براث دیگر اضافه شد و سپس ۵۰ میکرولیتر از عصاره هر کدام از گیاهان با غلظت ۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به صورت جداگانه اضافه شد. این محلول با سمپلر مخلوط شده سپس ۱۰۰ میکرولیتر از این محلول سمپل و به چاهک دوم اضافه شد. سپس با سمپلر مخلوط و بدین ترتیب غلظت عصاره نصف شد. این عمل، رقیقسازی تا چاهک دهم ادامه پیدا کرد. در چاهک دهم ۱۰۰ میکرولیتر محلول برداشته شده دور ریخته شد و چاهک ۱۱ و ۱۲ به عنوان کنترل مثبت و منفی در نظر گرفته شدند. جدول۱ کنترل مثبت شامل باکتری و محیط کشت و کنترل منفی محیط کشت و آب مقطر است. در آخر به هر ردیف از چاهک‌ها ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه باکتری رقیق شده اضافه شد و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نتیجه مشاهده شد(۱۱ ، ۱۲).

بررسی کم‌ترین غلظت کشندگی (□□□) عصاره‌های گیاهی:

بعد از ۲۴ ساعت از انجام MIC و با توجه به نتایج حداقل غلظت بازدارندگی، حداقل غلظت کشندگی نیز تعیین شد. به این ترتیب که از تمام خانه‌هایی که رشد باکتری در آن‌ها متوقف شده بود و کدورتی مشاهده نشد، روی پلیت‌های حاوی محیط کشت مولرهینتون آگار کشت داده شد و ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد درون انکوباتور قرار داده شدند. غلظت‌های اضافه شده به پلیت‌هایی که بعد از ۲۴ ساعت فاقد رشد بودند، به عنوان MBC گزارش شدند، یعنی کم‌ترین غلظت هر عصاره که به طور کامل سبب مرگ باکتری‌ها شده و هیچ‌گونه رشدی در آن مشاهده نشده است(۱۱).

بررسی اثر مهاری عصاره‌های گیاهی بر تولید بیوفیلم:

برای بررسی اثر غلظت تحت‌کشنده اسانس آویشن شیرازی، رزماری و نعناع فلفلی بر میزان تولید بیوفیلم *سودوموناس ائروژینوزا*، ابتدا در غیاب مواد ضدمیکروبی و سپس در حضور حداقل غلظت‌کشنده از اسانس اندازه‌گیری و مقادیر به دست آمده مقایسه شدند. برای اندازه‌گیری میزان تولید بیوفیلم، ابتدا سویه باکتری در محیط کشت تریپتیک سوی براث (TSB)در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شد. سپس رقیق‌سازی باکتری به نسبت۱:۱۰۰ انجام شد. به این صورت که ۱ میلی-لیتر از باکتری رشد یافته درون لوله استریل ریخته و ۹۹ میلیلیتر از محیط کشت TSB به آن اضافه شد. در مرحله بعد، به پلیت‌های الیزای ته صاف با جنس پلی‌استرین، ۱۲۵ میکرولیتر از محلول باکتری تلقیح شده، در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و به مدت ۲۴ ساعت در درون انکوباتور قرار داده شد. سپس هر کدام از چاهک‌هاسه بار با ۳۰۰ میکرولیتر آب مقطر شست‌وشو و در دمای اتاق خشک شدند. به هریک از چاهک‌ها ۱۲۵ میکرو لیتر از محلول کریستال ویوله۱/۰درصد، برای رنگ‌آمیزی بیوفیلم اضافه و سپس انکوباسیون به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انجام شد. دوباره پس از رنگ‌آمیزی سه بار با آب مقطر شست‌وشو داده و پس از خشک شدن میکروپلیت‌ها ۱۲۵ میکرولیتر از محلول اسید استیک ۳۰ درصد در آب، برای حل کردن رنگ متصل به چاهک‌ها، به هر چاهک اضافه شد. سپس محتویات هر چاهک به پلیت‌های ته صاف جدید تلقیح شد. جذب محلول رنگ‌بری در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه Synergy™ HTX Multi-Mode Microplate Reader (ساخت شرکت Bio Tech) خوانش و ثبت شد. برای مقایسه میزان کاهش تولید بیوفیلم در شرایط مختلف آزمایش، نسبت جذب نوری بیوفیلم تشکیل شده، توسط سویه تحت آزمایش، انکوبه شده با عصاره‌های مختلف، در مقایسه با جذب نوری بیوفیلم تولیدی *سودوموناس ائروژینوزا*، بدون

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-05-17]

مواد ضدمیکروبی، محاسبه شدند. جذب نوری بیوفیلم سویه تحت آزمایش در غیاب مواد ضد میکروبی، ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شد. نسبت جذب نوری بر اساس تعیین نسبت جذب نوری در حضور ماده ضدمیکروبی به جذب نوری بدون حضور ماده ضدمیکروبی محاسبه شد. نسبت جذب نوری پایین‌تر، نشان‌دهنده اثر مهاری بیشتر تیمار انجام شده روی تولید بیوفیلم است(۱۳).

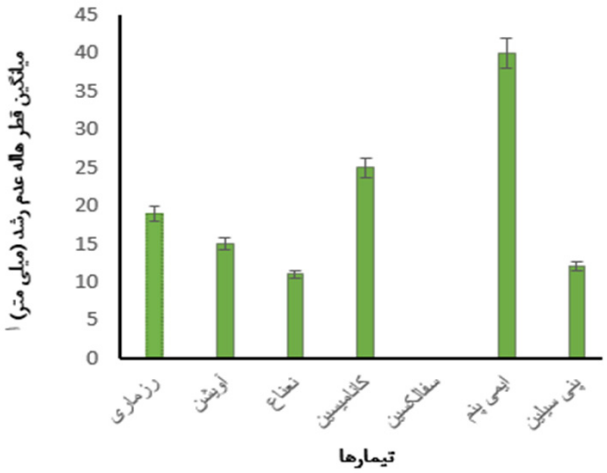
آنالیز آماری:

برای دستیابی به نتایج آماری دقیق‌تر هر آزمون سه بار تکرار شد و نتایج به صورت میانگین و خطای استاندارد (ST) بیان شدند. تست Shapiro–Wilk نشان داد که همهی داده‌ها توزیع نرمال دارند. بنابراین تست Tukey برای مقایسه میانگین‌ها استفاده شد. البته در صورتی که آنالیز یک طرفه واریانس (آنووا) از مدل خطی عمومی یک تفاوت معنادار(P < ۰۵/۰) داشته باشد. همه آنالیزهای آماری با استفاده نرم‌افزار آماری SPSS ورژن ۱۶ (SPSS, Chicago, Illinois, USA) انجام شدند.

یافته‌ها

تست آنتی‌بیوگرام:

در این مطالعه چهار نوع دیسک آنتی‌بیوتیکی برای مقایسه با عصاره‌های گیاهان مورد نظر به کار برده شدند. پس از انجام روش نشر در آگار نتایج به صورت زیر به دست آمد: باکتری *سودوموناس ائروژینوزا* در این مطالعه به آنتی‌بیوتیک کانامایسین و ایمی‌پنم حساسیت داشت و قطر هاله عدم رشد به دست آمده از روش نشر در آگار این دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی به ترتیب ۲۵ میلی‌متر و ۴۰ میلی‌متر اعلام شد. در حالی که این باکتری به آنتی‌بیوتیک سفالکسین مقاوم بوده و حساسیت آن به پنی‌سیلین نیز پایین بود. قطر هاله عدم رشد برای این دو آنتی‌بیوتیک به ترتیب ۰ و ۱۱میلی‌متر گزارش شد(شکل ۱).



شکل ۱. مقایسه قطر هاله عدم رشد ایجاد شده به وسیله عصاره گیاهان و آنتی‌بیوتیک‌های‌مرسوم

برایمقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد عصاره گیاهان و آنتی‌بیوتیک‌های مختلف استفاده‌شده علیه گونه *سودوموناس ائروژینوزا* از آزمون آنالیز واریانس یکطرفه و تست Tukey استفاده شد. نتایج آزمون توکی در مقایسه دو به دو میان میانگین قطر هاله عدم رشد عصاره گیاهان و آنتی‌بیوتیک‌های استفاده شده (جدول ۱) نشان داد که عصاره رزماری با عصاره آویشن شیرازی و نعناع فلفلی و آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین، سفالکسین، ایمی‌پنم و پنی‌سیلین اختلاف معناداری دارد .(P < ۰۵/۰) مقایسه دو به دو میانگین قطر هاله عدم رشد عصاره نعناع فلفلی با سایر عصاره‌ها و آنتی‌بیوتیک‌های استفاده شده نشان داد که عصاره نعناع فلفلی با آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین، سفالکسین، ایمی‌پنم و عصاره گیاهان آویشن شیرازی و رزماری اختلاف معناداری دارد (P < ۰۵/۰) . همچنین مقایسه دو به دو میانگین قطر هاله عدم رشد عصاره آویشن شیرازی سایر عصاره-ها وآنتی‌بیوتیک‌های استفاده شده نشان داد که عصاره آویشن شیرازی با عصاره رزماری و نعناع فلفی و آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین، سفالکسین، ایمی‌پنم و پنی‌سیلین اختلاف معناداری وجود داشته (P < ۰۵/۰) و همچنین مقایسه دو به دو میانگین قطر هاله عدم رشد عصاره نعناع فلفلی با آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین اختلاف معناداری وجود ندارد.(P<۰۵/۰) عدد مقابل هر آنتی‌بیوتیک میزان دوز حساسیت آن را نشان می‌دهد. در جدول ۱ Std. Error، انحراف استاندارد و sig، معناداری آماری است.

نتایج حاصل از بررسی کم‌ترین غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی رشد عصاره‌های گیاهی:

بر اساس نتایج به دست آمده عصاره الکلی گیاه رزماری در غلظت ۳، ۱/۵ و ۰/۷۵میلی‌گرم بر میلی‌لیتر دارای اثر مهارکنندگی رشد بر باکتری *سودوموناس ائروژینوزا* بوده است. بنابراین عصاره الکلی رزماری MIC برابر با ۰/۷۵میلی‌گرم بر میلی‌لیتر داشته است. این درحالی است که آویشن شیرازی و نعناع فلفلی فقط در غلظت‌های ۳و ۱/۵میلی‌گرم بر میلی‌لیتر دارای اثر مهارکنندگی رشد بر باکتری *سودوموناس ائروژینوزا* بوده‌اند. بنابراین عصاره اتانولی آویشن شیرازی و نعناع فلفلی MIC برابر ۱/۵ میلی‌گرم بر میلی-لیتر داشته‌اند. اثر کشندگی هر سه گیاه در غلظت ۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اتفاق افتاد.

بیوفیلم:

ببرای بررسی اثر عصاره‌های گیاهان رزماری، آویشن شیرازی و نعناع فلفلی بر تولید بیوفیلم، میزان جذب نوری پلیت حاوی عصاره‌های مختلف و باکتری در طول موج ۵۵۰ تا ۶۵۰ توسط دستگاه خوانش الایزا خوانده و در جدول ۲ به نمایش درآمد.

بنابر نتایج به دست آمده مطابق جدول،۲ اثرگذاری عصاره‌های گیاهی و ممانعت از ایجاد و تشکیل بیوفیلم، در چاهک‌های اولیه که غلظت عصاره‌های گیاهی بالاتر است، میزان تشکیل بیوفیلم کم بوده و دستگاه خوانش الایزا میزان جذب پایین‌تر و با کاهش غلظت عصاره‌های گیاهی به ترتیب در چاهک‌های ۱ تا ۱۰، میزان تشکیل بیوفیلم بیشتر بوده و دستگاه خوانش الایزا، میزان جذب بالاتری را نشان داده است. با توجه به این نتایج گیاه رزماری بیشترین تاثیر را بر تشکیل بیوفیلم داشته و در غلظت‌های ۳ و ۵/۱ باعث کاهش تشکیل بیوفیلم شده است. اما نعناع فلفلی و آویشن شیرازی این میزان تأثیر را نداشته و در غلظت ۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مانع تشکیل بیوفیلم شده‌اند.

جدول ۲. نتایج خوانش جذب نوری سنجش بیوفیلم توسط دستگاه الیزا

	غلظت عصاره گیاه									
	3	1/5	0/75	0/37	0/18	0/09	0/04	0/02	0/01	0/005
آویشن شیرازی	0/227	1/283	1/383	1/456	1/526	1/551	1/558	1/623	1/639	1/703
رزماری	0/04	1/044	1/32	1/442	1/529	1/569	1/558	1/615	1/629	1/664
نعناع فلفلی	1/324	1/385	1/409	1/588	1/603	1/699	1/732	1/797	1/831	1/865

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-05-17]

جدول۱. نتایج آنالیز آماری تست Tukey جهت مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد مورد استفاده در این مطالعه

(I) p	(j) p	Mean Difference (I-j)	ST	sig	95% Confidence Interval Lower Bound	95% Confidence Interval Upper Bound
Rosmarinus officinalis L	Mentha piperita L	7.00000*	.90851	.000	3.8978	10.1022
	Zataria multiflora Bioss	3.66667*	90.851	.016	.5645	6.7689
	K5	-6.00000*	90.851	.000	-9.1022	-2.8978
	CN30	19.00000*	.90851	.000	15.8978	22.1022
	P10	7.00000*	.90851	.000	3.8978	10.1022
	IMP10	-20.33333*	.90851	.000	-23.4355	-17.2311
Mentha piperita L	Rosmarinus officinalis L	-7.00000*	.90851	.000	-10.1022	-3.8978
	Zataria multiflora Bioss	-3.33333*	.90851	.032	-6.4355	-2.311
	K5	-3.00000*	.90851	.000	-16.1022	-9.8978
	CN30	12.00000*	.90851	.000	8.8978	15.1022
	P10	.00000	.90851	1.000	-3.1022	3.1022
	IMP10	-27.33333*	.90851	.000	-30.4355	-24.2311
Zataria multiflora Bioss	Rosmarinus officinalis L	-3.66667*	.90851	.016	-6.7689	-.5645
	Mentha piperita L	3.33333*	.90851	.032	.2311	6.4355
	K5	-9.66667*	.90851	.000	-12.769	-6.5645
	CN30	15.33333*	.90851	.000	12.2311	18.4355
	P10	3.33333*	.90851	.032	.2311	6.4355
	IMP10	-24.00000*	.90851	.000	-27.1022	-20.8978
K5	Rosmarinus officinalis L	6.00000*	.90851	.000	.8978	9.1022
	Mentha piperita L	13.00000*	.90851	.000	9.8978	16.1022
	Zataria multiflora Bioss	9.66667*	.90851	.000	6.5645	12.7689
	CN30	25.00000*	.90851	.000	21.8978	28.1022
	P10	13.00000*	.90851	.000	9.8978	16.1022
	IMP10	-14.33333*	.90851	.000	-17.4355	-11.2311
CN30	Rosmarinus officinalis L	-19.00000*	.90851	.000	-22.1022	-15.8978
	Mentha piperita L	-12.00000*	.90851	.000	-15.1022	-8.8978
	Zataria multiflora Bioss	--15.00000*	.90851	.000	-18.4355	-12.2311
	K5	-25.00000*	.90851	.000	-28.10	-21.8978
	P10	-12.00000*	.90851	.000	-15.1022	-8.8978
	IMP10	-39.33333*	.90851	.000	-42.4355	-36.2311
P10	Rosmarinus officinalis L	-7.00000*	.90851	.000	-10.1022	-3.8978
	Mentha piperita L	.00000	.90851	1.000	-3.1022	3.1022
	Zataria multiflora Bioss	-3.33333*	.90851	.032	-6.4355	-.2311
	K5	-3.00000*	.90851	.000	-16.1022	-9.8978
	CN30	12.00000*	.90851	.000	8.8978	15.1022
	IMP10	-27.3333*	.90851	.000	-30.4355	-232311
IMP10	Rosmarinus officinalis L	20.33333*	.90851	.000	17.2311	23.4355
	Mentha piperita L	27.33333*	.90851	.000	24.2311	304355
	Zataria multiflora Bioss	24.00000*	.90851	.000	20.8978	27.1022
	K5	14.33333*	.90851	.000	11.2311	17.4355
	CN30	3933333*	.90851	.000	36.2311	4.4355
	P10	27.3333*	.90851	.000	24.2311	30.4355

پنی‌سیلین :P سفالکسین و :CN،ایمی‌پنم:IMP، کانامایسین:K

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-05-17]

بحث

تحقیق نشان داد که قطر هاله عدم رشد برای هر عصاره‌گیاهی و هر کدام از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی بررسی شد(شکل ۱). در مطالعه‌های مشابهی که به بررسی اثر چندین عصاره گیاهی از جمله آویشن شیرازی بر باکتری‌های پاتوژن از جمله *سودوموناس ائروژینوزا* پرداخته شده، قطر هاله عدم رشد بر اثر عصاره آویشن شیرازی ۴میلی‌متر اعلام شده است (۱۴).

در مطالعه‌های مشابهی که به بررسی اثر عصاره رزماری روی باکتری گونه‌های *سودوموناس ائروژینوزا* پرداخته شده است، MIC بین ۵ تا ۲۵ میکرولیتر بر میلی‌گرم را بیان کرده اند(۱۵). در مطالعه بررسی شده دیگری MIC به دست آمده برای آویشن شیرازی ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و MBC نیز ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر لیتر اعلام شده است (۱۶). Tyagi و همکارانش به بررسی تاثیر نعناع فلفلی بر باکتری‌ها و قارچ‌ها پرداختند که میزان MIC برای باکتری سودوموناس آئروژینوزا را ۲/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آوردند که با نتایج دست آمده برای ما همخوانی دارد(۸). تفاوت در اندازه قطر هاله عدم رشد و همچنین MIC و MBC عصاره گیاهان نام‌برده چندین دلیل متفاوت می‌تواند داشته باشد. نخستین مورد اینکه ترکیب‌های عصاره‌های گیاهی، متنوع هستند که به آب و هوا و شرایط منطقه جمع-آوری نمونه گیاهی، بستگی دارد(۱۷). مورد دوم در این تفاوت، روش استفاده شده در ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی و انتخاب سویه‌های باکتریایی است. یکی از دلایل دیگر می‌تواند ماهیت هیدروفوبیک این عصاره‌ها باشد که مانع دیفیوژن و پخش مناسب و کافی عصاره در محیط کشت آگار می‌شود(۱۷ ، ۱۸). از طرف دیگر تفاوت در نوع عصاره‌گیری موضوع بسیار مهم و قابل بررسی در این زمینه است. در مطالعه‌های فراوان انواع عصاره‌های گیاهان مذکور استفاده شده است. عصاره اتانولی، متانولی، آبی، کلروفورمی، اتیل استات و هگزانی از این موارد است. همه این عصاره‌ها بر باکتری‌های مختلف از جمله *سودوموناس ائروژینوزا* اثردهی شده‌اند(۱۶). در برخی از مطالعه‌ها به این موضوع اشاره شده است که استفاده از قسمت-های مختلف گیاه مانند ریشه، برگ و ساقه در تأثیرگذاری عصاره بر باکتری مورد نظر موثر هستند. البته انتخاب این قسمت به نوع گیاه بستگی دارد. به طور مثال برای گیاه نعناع فلفلی بهتر است از برگ گیاه برای عصاره‌گیری استفاده شود(۶). در مطالعه دیگری اثر Chamaemelum بر تشکیل بیوفیلم در باکتری *سودوموناس ائروژینوزا* بررسی شد و نتایج نشان داد که عصاره این گیاه در غلظت‌های ۲۵/۶ تا ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر تشکیل بیوفیلم اثر مهاری دارد(۱۹). همچنین محققان به بررسی تاثیر عصاره-های مختلف سیر (متانولی و اتانولی) بر مهار تشکیل بیوفیلم در باکتری‌های پاتوژن پرداختند که نتایج در باکتری‌های متفاوت، غلظت‌های مختلف و انواع عصاره‌ی سیر، متفاوت بود(۲۰).

نتیجه‌گیری

بر اساس مقادیر MIC و MBC به دست آمده سه عصاره الکلی گیاهان استفاده شده، اثر مهارکنندگی رشد و کشندگی باکتری در این سه گیاه نشان داد که رزماری دارای تاثیر بیشتری بر مهار رشد باکتری *سودوموناس ائروژینوزا* است. با بررسی اثر عصاره‌های گیاهی مختلف بر تشکیل بیوفیلم توسط *سودوموناس ائروژینوزا* مشخص شد که رزماری بیشترین تأثیر را بر کاهش توانایی تولید بیوفیلم توسط این باکتری دارد. بنابراین با انجام مطالعه‌های بیشتر روی اثر ضد باکتریایی عصاره‌های گیاهی می‌توان از این ترکیب‌ها با غلظت‌های موثر به عنوان ترکیب‌های دارویی مناسب برای درمان عفونت‌های باکتریایی استفاده کرد. مهم‌ترین پیشنهاد برای ادامه این مطالعه، بررسی مکانیسم عمل عصاره‌گیاهی روی مهار رشد باکتری و تشکیل بیوفیلم است که می‌تواند از طریق روش داکینگ مولکولی یا روش‌های تجربی انجام شود.

منابع:

1. Imperial IC, Ibana JA. Addressing the antibiotic resistance problem with probiotics: reducing the risk of its double-edged sword effect. Frontiers in microbiology. 2016 Dec 15; 7:1983.
2. Bakal SN, Bereswill S, Heimesaat MM. Finding novel antibiotic substances from medicinal plants—antimicrobial properties of Nigella sativa directed against multidrug resistant bacteria. European Journal of Microbiology and Immunology. 2017 Mar; 7(1):92-8.
3. Waller SB, Cleff MB, Serra EF, Silva AL, dos Reis Gomes A, de Mello JR, de Faria RO, Meireles MC. Plants from Lamiaceae family as source of antifungal molecules in humane and veterinary medicine. Microbial pathogenesis. 2017 Mar 1; 104: 232-7.
4. Ribeiro-Santos R, Carvalho-Costa D, Cavaleiro C, Costa HS, Albuquerque TG, Castilho MC, Ramos F, Melo NR, Sanches-Silva A. A novel insight on an ancient aromatic plant: The rosemary (Rosmarinus officinalis L.). Trends in Food Science & Technology. 2015 Oct 1; 45(2):355-68.
5. Saeidi S, Hassanpour K, Ghamgosha M, Heiat M, Taheri RA, Mirhosseini A, Farnoosh G. Antibacterial activity of ethyl acetate and aqueous extracts of Mentha longifolia L. and hydroalcoholic extract of Zataria multiflora Boiss. plants against important human pathogens. Asian Pacific journal of tropical medicine. 2014 Sep 1; 7: S186-9.
6. Shalayel MH, Asaad AM, Qureshi MA, Elhussein AB. Anti-bacterial activity of peppermint (Mentha piperita) extracts against some emerging multi-drug resistant human bacterial pathogens. Journal of Herbal Medicine. 2017 Mar 1; 7: 27-30.
7. Smaoui S, Hsouna AB, Lahmar A, Ennouri K, Mtibaa-Chakchouk A, Sellem I, Najah S, Bouaziz M, Mellouli L. Bio-preservative effect of the essential oil of the endemic Mentha piperita used alone and in combination with BacTN635 in stored minced beef meat. Meat Science. 2016 Jul 1; 117:196-204.
8. Tyagi AK, Malik A. Antimicrobial potential and chemical composition of Mentha piperita oil in liquid and vapour phase against food spoiling microorganisms. Food Control. 2011 Nov 1; 22(11):1707-14.
9. Sharma G, Rao S, Bansal A, Dang S, Gupta S, Gabrani R. Pseudomonas aeruginosa biofilm: potential therapeutic targets. Biologicals. 2014 Jan 1; 42(1):1-7.
10. Forbes, B. A., Sahm, D. F., & Weissfeld, A. S. (1998). Scott & Bailey's diagnostic microbiology. Mosby.
11. Saad R, Asyikin N, Khan J, Aldahlli S, Sultan S, Abdulhamid J, Yusuf E, Asmani F. Determination of minimum inhibitory concentration utilizing microtitre plate bioassay for three Malaysian Herbal Medicines. International Journal of Applied Pharmaceutical Sciences and Biomedical Sciences. 2014; 3(1):280-90.
12. Zaouali Y, Bouzaine T, Boussaid M. Essential oils composition in two Rosmarinus officinalis L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities. Food and Chemical Toxicology. 2010 Nov 1; 48(11):3144-52.
13. Fonseca, A. P., Extremina, C., Fonseca, A. F., & Sousa, J. C. (2004). Effect of subinhibitory concentration of piperacillin/tazobactam on Pseudomonas aeruginosa. Journal of medical mi-

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-05-17]

crobiology, 53(9), 903-910
14. Akrami F, Rodríguez-Lafuente A, Bentayeb K, Pezo D, Ghalebi SR, Nerín C. Antioxidant and antimicrobial active paper based on Zataria (Zataria multiflora) and two cumin cultivars (Cuminum cyminum). LWT-Food Science and Technology. 2015 Mar 1; 60(2):929-33.
15. Jardak M, Elloumi-Mseddi J, Aifa S, Mnif S. Chemical composition, anti-biofilm activity and potential cytotoxic effect on cancer cells of Rosmarinus officinalis L. essential oil from Tunisia. Lipids in health and disease. 2017 Dec; 16(1):190.
16. Aida A, Ali MS, Behrooz MV. Chemical composition and antimicrobial effect of the essential oil of Zataria multiflora Boiss endemic in Khorasan-Iran. Asian Pacific Journal of Tropical Disease. 2015 Mar 1; 5(3):181-5.
17. Azmir J, Zaidul IS, Rahman MM, Sharif KM, Mohamed A, Sahena F, Jahurul MH, Ghafoor K, Norulaini NA, Omar AK. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. Journal of food engineering. 2013 Aug 1; 117(4):426-36.
18. 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 May 1; 81(2):121-6.
19. Lu L, Hu W, Tian Z, Yuan D, Yi G, Zhou Y, Cheng Q, Zhu J, Li M. Developing natural products as potential anti-biofilm agents. Chinese medicine. 2019 Dec 1; 14(1):11.
20. Mohsenipour Z, Hassanshahian M. The effects of Allium sativum extracts on biofilm formation and activities of six pathogenic bacteria. Jundishapur journal of microbiology. 2015 Aug; 8(8).

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-05-17]