

## بررسی خاصیت ضد میکروبی عصاره های اتانولی گیاهان آویشن، مورد و سیر بر روی تشکیل بیوفیلم استافیلوکوکوس آرتوس

زهرا سپهری<sup>۱</sup>، علی اکبر نصیری<sup>۲</sup>، مهران حصارکی<sup>۳</sup>، فرشته جوادیان<sup>۴\*</sup>، زهره کیانی<sup>۵</sup>، زیبا فولادوند<sup>۶</sup>

<sup>۱</sup> استادیار، پزشک، گروه داخلی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زابل، ایران

<sup>۲</sup> استادیار، پزشک، گروه بیهوشی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زابل، ایران

<sup>۳</sup> استادیار، پزشک، گروه اطفال و نوزادان، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زابل، ایران

<sup>۴</sup> کارشناس ارشد تکوین، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی زابل، ایران

<sup>۵</sup> دانش آموخته پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، ایران

<sup>۶</sup> کارشناس ارشد بیوتکنولوژی، مرکز تحقیقات و فناوری (بیوسنتز)، دانشگاه ملی زابل، ایران

نشانی نویسنده مسئول: کارشناس ارشد تکوین، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی زابل، ایران، فرشته جوادیان

E-mail: fereshteh.javadian@yahoo.com

وصول: ۹۳/۳/۲۸، اصلاح: ۹۳/۴/۲۹، پذیرش: ۹۳/۵/۵

### چکیده

**زمینه و هدف:** جمعیت های مشکل از یک گونه یا گونه های متنوع باکتری به صورت چسبیده به یکدیگر و یا به سطوح زنده و غیر زنده در زمینه ای از پلی ساکاریدهای خارج سلولی بیوفیلم نامیده می شود. توسعه بیوفیلم یک فرآیند پیچیده است که نیازمند رفتارهای جمعی باکتری می باشد و در مقایسه با زندگی منفرد فواید زیادی را برای باکتری در بر دارد. بیوفیلم پراکنش باکتری و بیماری زایی باکتری را افزایش می دهد. از آنجایی که این باکتری ها نسبت به آنتی بیوتیک های مختلف مقاوم می باشد؛ امروزه از عصاره های گیاهی برای از بین بردن آنها استفاده می کنند. هدف این تحقیق بررسی اثر ضد میکروبی عصاره های چند نمونه گیاهی بر روی میزان تشکیل بیوفیلم استافیلوکوکوس آرتوس مقاوم به آنتی بیوتیک است.

**مواد و روش ها:** ۱۷ سویه استافیلوکوکوس اورئوس از حلق و بینی افراد بیمارستانی و غیر بیمارستانی جدا شده است و بررسی اثر عصاره های گیاهی بر روی تشکیل بیوفیلم استافیلوکوکوس اورئوس با استفاده از میکروپلیت های ۹۶ خانه تعیین شده است.

**یافته ها:** اثر ضد باکتریایی عصاره گیاهان سیر، آویشن و مورد در غلظت های مختلف نشان داد که علی رغم مقاومت نسبی اکثر سویه ها در غلظت های مورد استفاده، بیشترین حساسیت در غلظت های ۱.۲۵، ۲.۵ و ۵ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره ها می باشد و غلظت ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر از همه عصاره ها به عنوان (حداقل غلظت کشندگی) MBC در نظر گرفته شده است. در غلظت های MIC هر عصاره گیاه تشکیل بیوفیلم به طور کامل متوقف شده و در زمان ۲۴ ساعت تنها رشد باکتری مشاهده شده و هیچ گونه بیوفیلمی در معرض هیچ کدام از عصاره ها دیده نشد؛ در صورتی که در کنترل بدون عصاره از زمان ۲۴ ساعت تشکیل بیوفیلم شروع شده و در ۶ ساعت بیشترین تشکیل بیوفیلم اما، در ۲۴ ساعت میزان بیوفیلم کم تر شده است.

**نتیجه گیری:** نتایج نشان داد که عصاره های گیاهی کاهش دهنده تشکیل بیوفیلم استافیلوکوکوس اورئوس می باشند؛ این امر نقش مهمی در کاهش بیماری دارد.

**واژه های کلیدی:** عصاره گیاهی، بیوفیلم، استافیلوکوکوس اورئوس، مقاومت آنتی بیوتیکی.

**مقدمه**

استافیلوکوکوس اورئوس یک باکتری گرم مثبت است که در پوست رشد و نمو می کند و در قسمت ابتدایی بیمی ۲۵ تا ۳۰ درصد افراد بدون نشانه های بالینی مشخص وجود دارد و به عنوان مهمترین مخازن گسترش آلودگی شناخته می شوند. استافیلوکوکوس اورئوس یکی از باکتری های بیماری زایی است که تولید کاتالاز می کند. این باکتری نقش مهمی در بروز مسمومیت های غذایی، عفونت های چرکی، سیستمیک و بیمارستانی دارد (۱). استافیلوکوکوس اورئوس دومین عامل بیماری زایی در عفونت های بیمارستانی می باشند. مقاومت استافیلوکوکوس اورئوس به پنی سیلین از سال ۱۹۵۰ آغاز شده و با ظهور آنتی بیوتیک های جدیدتر موارد مقاومت به این داروها نیز افزایش یافت (۲،۳) و از سال ۱۹۹۸ استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین و به صورت نسبی به ونکوماسین گزارش گردیده است. این باکتری ها برای ایجاد بیماری فاکتورهای مختلفی از جمله بیوفیلیم تولید می کند که جمعیت هایی متشکل از یک گونه یا گونه های متنوع باکتری به صورت چسبیده به یکدیگر و یا به سطوح زنده و غیر زنده از پلی ساکاریدهای خارج سلولی بیوفیلیم نامیده می شود. تشکیل بیوفیلیم شامل مراحل زیر می باشد: ۱- اتصال برگشت پذیر سلول های پلانکتونیک به سطوح ۲- اتصالات برگشت ناپذیر سلول ها و تشکیل میکروکلنی ۳- تولید مواد پلیمری خارج سلولی ۴- بلوغ نهایی بیوفیلیم (۴). بیوفیلیم ها می توانند بر روی سطوح مختلفی تشکیل شوند (۵). این باکتری ها برای ایجاد بیماری فاکتورهای مختلفی از جمله بیوفیلیم تولید می کند (۶). بیوفیلیم یک جامعه ساختاری و بیانگر اجتماعی از میکرواورگانیسم است که توسط محصولات پلی مری لعابی که خودشان تولید کرده اند در فضای موجود ما بین آنها قرار می گیرد و به یک سطح متصل می شود (۷). تشکیل بیوفیلیم یک فرآیند فعال است و شامل اتصال اولیه، تشکیل

میکروکلنی، تولید ماده پلی مریک خارج سلولی، به دنبال آن رشد و بلوغ و در نهایت کنده شدن و رهایی سلول از بیوفیلیم می باشد (۷). گسترش بیوفیلیم علت اصلی عفونت های بیمارستانی می باشد؛ چرا که باکتری که به سطح متصل شده و به وسیله پلی ساکارید خارجی در برابر انواع مختلف آنتی بیوتیک ها و دیگر استرس های محیطی محافظت می شود و بیوفیلیم پراکنش باکتری و بیماری زایی باکتری را افزایش می دهد. بیان فنوتیپ مثبت بیوفیلیم وابسته به حضور گلوکز، کلرید سدیم (NaCl) و دیگر شرایط محیطی می باشد (۶). چون این باکتری ها نسبت به آنتی بیوتیک های مختلف مقاوم می باشند به تازگی با توجه به اثرات جانبی آنتی بیوتیک های مصرفی و مقاومتی که پاتوژن هایی نظیر استافیلوکوکوس اورئوس در برابر آن ها کسب نموده اند، به عملکرد ضد میکروبی عصاره ها و ترکیبات طبیعی گونه های مختلف گیاهی توجه زیادی شده است. هدف از این تحقیق در ابتدا بررسی اثر ضد میکروبی عصاره گیاهان، آویشن، مورد و سیر علیه جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به آنتی بیوتیک استفاده شده است.

**مواد و روش ها****تهیه عصاره**

گونه مورد استفاده در این تحقیق از استان سیستان و بلوچستان و کرمان جمع آوری شد و مورد تأیید گیاه شناس دانشگاه قرار گرفت. گیاه خرد شد. جهت تهیه عصاره ۴۰ گرم پودر خشک گیاه در داخل ارلن های نیم لیتری حاوی ۲۰۰ میلی لیتر اتانول ۹۶٪ قرار داده شد. جداسازی حلال از عصاره با دستگاه روتاری و با کمک پمپ خلا (تقطیر در خلا) انجام گرفت. عصاره حاصل وزن و در حلال DMSO حل شد. عصاره تا زمان استفاده در آزمایش های ضد میکروبی در دمای ۴ درجه سانتی گراد در یخچال نگهداری شد (۸).

**سویه ها باکتری**

۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت خارج گردید. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی حاوی  $10^7$  واحد در میلی لیتر معادل ۰/۵ مک فارلند به همه چاهک ها اضافه شد و در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت. اولین چاهکی که از رشد باکتری پس از قرار دادن در انکوباتور جلوگیری کرده است به عنوان (MIC) در نظر گرفته می شود (۱).

**روش میکروتیتر پلیت برای تعیین کمیّت تشکیل بیوفیلم توسط باکتری‌ها**

مراحل انجام آزمایش

برای سنجش قدرت تشکیل بیوفیلم توسط باکتری‌های جدا شده، یک کشت ۱۸ تا ۲۴ ساعته از هر ایزوله در تریپتیکاز سوی برات در دمای  $30^{\circ}\text{C}$  تهیه شد. سپس یک میلی‌لیتر از این محیط کشت به ۱۰ میلی‌لیتر از محیط TSB استریل اضافه شد و کدورت آن از طریق قرائت جذب نوری سوسپانسیون بین ۰/۰۸ تا ۰/۱ در طول موج ۶۲۵ nm تنظیم گردید. این عمل با دستگاه اسپکتروفوتومتر انجام شد. کدورت این سوسپانسیون معادل استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند می‌باشد و حاوی بیش از  $10^8$  باکتری در هر میلی‌لیتر است. سپس از این سوسپانسیون، ۲۵۰ میکرولیتر به هر چاهک در میکروپلیت انتقال داده شد. هر هشت چاهک در میکروپلیت با یک سوسپانسیون باکتریایی مشخص پر شدند که در این صورت در هر چاهک نزدیک به  $25 \times 10^6$  cfu/well باکتری موجود می‌باشد. چاهک‌های شاهد فقط حاوی محیط استریل می‌باشند. جنس میکروپلیت‌های ۹۶ چاهکی، پلی‌استیرن می‌باشد و ظرفیت هر چاهک ۳۰۰ میکرولیتر است و ۵۰ میکرولیتر از عصاره گیاه با غلظت ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر نیز استفاده شده است. سپس سطح پلیت‌ها پوشیده شد و انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  صورت گرفت. بعد از گذشت ۲۴ ساعت، محلول مواد غذایی و سوسپانسیون میکروبی از چاهک‌ها خارج شد و هر چاهک سه مرتبه توسط ۳۰۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژی

سویه های مختلف استافیلوکوکوس اورئوس مورد استفاده در این تحقیق از نمونه های بیماران شهرستان زابل جداسازی و بر روی محیط های کشت اختصاصی ماتیتول سالت آگار و بلاد آگار کشت داده شدند. سویه های خالص به دست آمده بر روی محیط کشت مصنوعی با استفاده از تست رنگ آمیزی گرم، کاتالاز، مانیتول سالت آگار در حد جنس شناسایی و در نهایت با انجام تست کوآگولاز به روش لوله ای و لامی و بررسی تشکیل آگلوتیناسیون، گونه استافیلوکوکوس اورئوس تعیین هویت شدند.

### فعالیت آنتی بیوتیکی

۱۷ سویه خالص از گونه استافیلوکوکوس اورئوس با روش کربی-بائر تعیین آنتی بیوگرام شده و حساسیت آنها نسبت به آنتی بیوتیک ها مورد ارزیابی قرار گرفت. آنتی بیوتیک های مورد استفاده در این بررسی شامل تری متوپریم SXT, (1.25+23.15  $\mu\text{g}$ ), آمپی سیلین (25  $\mu\text{g}$ ), AM, سفنازیدیم (30  $\mu\text{g}$ ), GAZ, تتراسیکلین (30  $\mu\text{g}$ ), TE, اریترومایسین E, (15  $\mu\text{g}$ ), پنی سیلین P, (10  $\mu\text{g}$ ), سفتریاکسون CRO, (30  $\mu\text{g}$ ), آمیکاسین AN, (10  $\mu\text{g}$ ) (ساخت شرکت پادتن طب) بودند. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی گراد قطر هاله های باز دارنده اندازه گیری شد و حساسیت و مقاومت سویه ها تعیین و نتایج آن با جدول استاندارد NCCLS مقایسه شد. تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC)

حساسیت جدایه های باکتری دارای مقاومت چند گانه نسبت به عصاره گیاهی مختلف با استفاده از روش رقت سازی در چاهک بررسی شد. به هفت چاهک از پلیت های میکروتیتر میزان ۱۰۰ میکرولیتر از محیط مایع مغذی مولر هیتتون برات (MHB) اضافه شد. به چاهک اول ۱۰۰ میلی لیتر از محلول رقیق شده عصاره اضافه شده و پس از مخلوط کردن ۱۰۰ میکرولیتر از چاهک اول برداشته به چاهک دوم اضافه گردید و بدین ترتیب تا آخرین چاهک این کار انجام داده شد. از چاهک آخر

گرفت تا خشک شوند. بعد از خشک شدن پلیت‌ها، بیوفیلیم‌ها به صورت حلقه‌های ارغوانی رنگی بر روی چاهک‌ها قابل مشاهده بودند. سپس سنجش کمی تولید بیوفیلیم به وسیله اضافه کردن ۲۰۰ میکرولیتر اسید استیک ۳٪ به هر چاهک صورت گرفت. سپس جذب نوری (OD) رنگ کریستال ویوله موجود در حلال رنگ بر در طول موج ۴۹۲ nm به وسیله دستگاه ELISA reader خوانده شد.

### یافته‌ها

#### واکنش باکتری به آنتی بیوتیک

فعالیت ضد باکتریایی چند آنتی بیوتیک علیه سویه های به دست آمده در شرایط آزمایشگاهی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج این آزمون نشان داد که سویه های استافیلوکوکوس اورئوس رفتار تقریباً مشابهی در شرایط

استریل شسته شد. همچنین پلیت‌ها به منظور حذف سلول‌های پلانکتونیک یا غیر متصل در حین شستن به شدت تکان داده می‌شوند. سپس باکتری‌های متصل به دیواره و کف چاهک، با ۲۵۰ میکرولیتر اتانول ۹۶٪ تثبیت شدند. بعد از ۱۵ دقیقه، محتویات چاهک‌ها تخلیه شد. پلیت‌ها برای خشک شدن در محلی در آزمایشگاه قرار گرفتند. بعد از خشک شدن، پلیت‌ها به مدت ۵ دقیقه با ۲۰۰ میکرولیتر رنگ کریستال ویوله ۲٪ که برای رنگ‌آمیزی گرم مورد استفاده قرار می‌گیرد، رنگ‌آمیزی شدند. بعد از گذشت این مدت زمان، رنگ‌های اضافی از طریق قرار دادن پلیت‌ها در مسیر جریان آب لوله شهری شسته شدند. این رنگ برای سنجش میزان بیوفیلیم بسیار مناسب است. همچنین می‌تواند برای سنجش اثرات بیوسایدها بر روی بیوفیلیم مورد استفاده قرار گیرد. بعد از شستن رنگ‌های اضافی، پلیت‌ها در دمای آزمایشگاه قرار

جدول ۱: الگوی حساسیت سویه های باکتری استافیلوکوکوس اورئوس مورد بررسی نسبت به آنتی بیوتیک‌ها

آنتی بیوتیک								*سویه باکتری
AN	CRO	P	E	TE	GAZ	AM	SXT	S. aureus
S	I	R	I	S	I	S	R	Sa1
S	I	R	R	R	R	R	R	Sa2
S	I	R	I	S	S	S	R	Sa3
S	I	R	R	I	S	R	R	Sa4
S	S	R	R	S	S	R	R	Sa5
S	I	R	R	I	S	R	R	Sa6
S	I	S	R	R	R	R	R	Sa7
S	I	R	R	R	S	R	R	Sa8
S	I	R	R	I	S	S	S	Sa9
R	R	R	R	I	S	R	R	Sa10
S	I	R	R	I	S	R	R	Sa11
S	I	R	R	S	R	R	S	Sa12
S	I	R	R	R	I	R	R	Sa13
S	R	R	R	I	R	I	R	Sa14
S	R	R	R	I	I	R	I	Sa15
R	R	R	R	I	S	R	S	Sa16
S	S	I	S	S	R	I	S	Sa17

Sa: Staphylococcus aureus\* R: Resistant S: Sensitive I: Intermediat  
CF=cefexime, CAZ=ceftazidime, CRO=ceftriaxone, AN=amikacin, P=penicillin,  
E=erythromycin, TE=tetracycline, AM= ampicillin, SXT=trimethoprim.

جدول ۲: اثر غلظت‌های مختلف عصاره گیاه در تشکیل بیوفیلیم استافیلوکوکوس اورئوس حساس به متی سیلین و نمونه کنترل در زمان ۲ ساعت

عصاره ها	0.62mg/ml concentration	1.25mg/ml concentration	2.5mg/ml concentration	5mg/ml concentration	10mg/ml concentration	0
۱- آویش	0.005	0.002	0.001	0	0	0.007
۲- سیر	0.005	0.004	0.003	0.001	0	0.008
۳- مورد	0.009	0.007	0.005	0.004	0.002	0.010

جدول ۳: اثر غلظت‌های مختلف عصاره گیاه در تشکیل بیوفیلم استافیلوکوکوس اورئوس حساس به متی‌سیلین و نمونه کنترل در زمان ۴ ساعت

عصاره ها	0.62mg/ml concentration	1.25mg/ml concentration	2.5mg/ml concentration	5mg/ml concentration	10mg/ml concentration	0
۱- آویشن	0.012	0.011	0.010	0.010	0.009	0.013
۲- سیر	0.008	0.008	0.007	0.005	0.004	0.010
۳- مورد	0.010	0.008	0.005	0.003	0.001	0.016

جدول ۴: اثر غلظت‌های مختلف عصاره گیاه در تشکیل بیوفیلم استافیلوکوکوس اورئوس حساس به متی‌سیلین و نمونه کنترل در زمان ۲۴ ساعت

عصاره ها	0.62mg/ml concentration	1.25mg/ml concentration	2.5mg/ml concentration	5mg/ml concentration	10mg/ml concentration	0
۱- آویشن	0.013	0.010	0.010	0.009	0.006	0.014
۲- سیر	0.011	0.009	0.005	0.003	0.002	0.011
۳- مورد	0.015	0.014	0.012	0.009	0.005	0.017

جدول ۵: اثر غلظت‌های مختلف عصاره گیاه در تشکیل بیوفیلم استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین و نمونه کنترل در زمان ۲ ساعت

عصاره ها	0.62mg/ml concentration	1.25mg/ml concentration	2.5mg/ml concentration	5mg/ml concentration	10mg/ml concentration	0
۱- آویشن	0.003	0.003	0.003	0.002	0.001	0.011
۲- سیر	0.009	0.007	0.004	0.003	0.003	0.010
۳- مورد	0.012	0.007	0.007	0.006	0.005	0.016

جدول ۶: اثر غلظت‌های مختلف عصاره گیاه در تشکیل بیوفیلم استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین و نمونه کنترل در زمان ۴ ساعت

عصاره ها	0.62 mg/ml concentration	1.25 mg/ml concentration	2.5 mg/ml concentration	5 mg/ml concentration	10 mg/ml concentration	0
۱- آویشن	0.011	0.011	0.010	0.009	0.008	0.012
۲- سیر	0.012	0.011	0.011	0.010	0.008	0.012
۳- مورد	0.015	0.014	0.011	0.010	0.006	0.022

جدول ۶: اثر غلظت‌های مختلف عصاره گیاه در تشکیل بیوفیلم استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین و نمونه کنترل در زمان ۲۴ ساعت

عصاره ها	0.62 mg/ml concentration	1.25 mg/ml concentration	2.5 mg/ml concentration	5 mg/ml concentration	10 mg/ml concentration	0
۱- آویشن	0.014	0.011	0.010	0.009	0.008	0.016
۲- سیر	0.014	0.012	0.010	0.008	0.005	0.015
۳- مورد	0.017	0.015	0.010	0.007	0.005	0.023

مقاومت نسبی اکثر سویه‌ها در غلظت‌های مورد استفاده، بیشترین حساسیت در غلظت‌های ۱، ۲، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره‌ها می‌باشد و غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از همه عصاره‌ها به عنوان MBC در نظر گرفته شده است. کنترل منفی در این مطالعه محیط کشت بدون باکتری و عصاره گیاه بوده است.

نتایج گذاشتن غلظت‌های مختلف عصاره بر تشکیل بیوفیلم

حضور آنتی‌بیوتیک‌ها از خود نشان می‌دهند؛ اما، با این وجود تفاوت‌هایی در بین جدایه‌ها در بروز عملکرد مقاومت یا حساسیت به آنتی‌بیوتیک دیده شد به طوری که ۶ سویه (سویه‌های شماره ۲، ۸، ۱۰، ۱۳، ۱۴) نسبت به اغلب آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم بودند (جدول ۱).

بیشترین و کم‌ترین غلظت عصاره

اثر ضدباکتریایی عصاره گیاهان سیر، آویشن و مورد در غلظت‌های مختلف نشان داد که علی‌رغم

در غلظت های MIC هر عصاره گیاه تشکیل بیوفیلیم به طور کامل متوقف شده و در زمان ۲۴ ساعت تنها رشد باکتری مشاهده شد و هیچ گونه بیوفیلیمی در معرض هیچ کدام از عصاره ها دیده نشد. در صورتی که در کنترل بدون عصاره از زمان ۲۴ ساعت تشکیل بیوفیلیم شروع شد و در ۶ ساعت بیشترین تشکیل بیوفیلیم امّا، در ۲۴ ساعت میزان بیوفیلیم کم تر شده است.

## بحث

تشکیل بیوفیلیم سبب می شود که باکتری ها به عوامل ضد میکروبی مقاوم شوند (۱۰،۹). با توجه به افزایش مقاومت باکتری ها به انواع آنتی بیوتیک ها تلاش برای دستیابی به آگاهی های بیشتر از موارد استفاده مؤثر ترکیبات موجود در گیاهان و کاربرد شان در درمان بیماری های مختلف صورت گرفته است. در این بررسی اثر عصاره اتانولی سیر، مورد و آویشن بر روی تشکیل بیوفیلیم سویه های مقاوم به متی سیلین و حساس به متی سیلین استافیلوکوکوس اورئوس که جزء بیمارگرهای عمده بیمارستانی بوده و سیر مقاومت آن به انواعی از آنتی بیوتیک ها رو به افزایش است، مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که اثر ضد باکتریایی عصاره گیاهان سیر، آویشن و مورد در غلظت های مختلف نشان داد که علی رغم مقاومت نسبی اکثر سویه ها در غلظت های مورد استفاده، بیشترین حساسیت در غلظت های ۱،۲۵، ۲،۵ و ۵ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره ها می باشد و غلظت ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر از همه عصاره ها به عنوان MBC در نظر گرفته شده است.

Yadegarinia فعالیت ضد میکروبی اسانس مورد در برابر اشرشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس و کاندیدا آلبیکنس نشان داد (۱۲). در مطالعه Moussa و همکاران نتایج نشان داد که عصاره متانولی مورد قطر هاله های

مهارتی ۲۵ و ۲۶ میلی متر به ترتیب در برابر Erwinia carotovora و Ralstonia solanacearum ایجاد کرده است (۱۳). در مطالعات تیموری نتایج نشان داد که اسانس آویشن دارای ۳۰ ترکیب می باشد که ترکیبات اصلی آن شامل تیمول (۲۹/۸٪) و کاراکرول (۱۳/۶٪) است بررسی فعالیت ضد میکروبی اسانس آویشن نشان می دهد که Staphylococcus aureus به آن حساس هستند در حالی که باکتری های گرم منفی (E. coli, Klebsial, pneumoniae) نسبت به اسانس هیچ حساسیتی از خود نشان ندادند (۱۴). در مطالعات آخوندزاده و همکاران اسانس آویشن با غلظت ۰/۰۵، ۰/۱۵ و ۰/۳ بر روی استافیلوکوکوس اورئوس مؤثر بوده و با افزایش غلظت اسانس رشد باکتری هم کاهش یافته است (۱۵). در مطالعه okoye و همکاران نتایج نشان داد عصاره گیاهی سیر دارای اثر ضد میکروبی بالایی علیه E. coli با قطر هاله مهارتی (۳۵-۱۷mm) و Staphylococcus aureus با قطر هاله مهارتی (۳۰-۱۶mm) است. همچنین حداقل غلظت مهار کننده (MIC) برای باکتری E. coli (۳۰mg/ml) و برای S. aureus (۵۰mg/ml) است (۱۶). در مطالعه مجنون و همکاران نتایج نشان داد که حداقل غلظت مهار کننده (MIC) عصاره گیاهی سیر برای استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به ونکومايسين ۲۵۶mg/ml است (۱۷).

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که حداقل غلظت مهار کننده عصاره هر گیاه باعث مهار تشکیل بیوفیلیم باکتری ها شده است و هیچ گونه بیوفیلیمی در معرض هیچ کدام از عصاره ها دیده نشد. در صورتی که در کنترل بدون عصاره (محیط کشت بدون عصاره) از زمان ۲۴ ساعت تشکیل بیوفیلیم شروع شده و در ۶ ساعت بیشترین تشکیل بیوفیلیم امّا، در ۲۴ ساعت میزان بیوفیلیم کم تر شده است و حلال نیز به عنوان کنترل در نظر گرفته شده است. در مطالعه Aishami نتایج نشان داد که عصاره چای ترش مهار کننده تشکیل بیوفیلیم کاندیدا آلبیکنس می باشد (۱۸). در مطالعه Namasivayam نتایج نشان داد که

برروی تشکیل بیوفیلم را می توان با اثرات این ذرات بر رشد باکتری ها مرتبط دانست. جلوگیری از رشد باکتری ها موجب عدم تشکیل بیوفیلم می شود.

### تشکر و قدردانی

از دانشگاه علوم پزشکی زابل که حمایت مالی این پروژه را برعهده گرفتند، تشکر به عمل می آید.

عصاره های گیاهان سنجد، نوعی پنج انگشت (بنگلا) *Tridax procumbens* and *Ocimum tenuiflorum* مهار کننده تشکیل بیوفیلم اشرشیاکلی با غلظت های مختلف می باشند (۱۹). در مطالعه کیم و همکاران نتایج نشان داد که عصاره زردچوبه *aCurcuma xanthoriz* مهار کننده تشکیل بیوفیلم استرپتوکوکوس موتانس می باشد (۲۰). در مطالعه حسینی و همکاران نتایج نشان داد که عصاره بنه تشکیل بیوفیلم استرپتوکوکوس موتانس کاهش داده است (۲۱). بنابراین، در مجموع، اثرات عصاره های گیاهی

### References

1. Kloos W.E. Staphylococcus. In: Topley & Wilson's Microbiology & Microbial infections. Collier L., Balows A., Sussman M. 9th. Arnold Co; USA. 1998;2: 577- 617.
2. Cunha BA, Methicillin resistant Staphylococcus aureus Clinical Manifestation and antimicrobial therapy. Clin Microbiol Infect. 2005; 11: 33-42.
3. CDC, Vancomycin-resistance Staphylococcus aureus-Pennsylvanian, 2002. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2002; 51(40): 902.
4. Bos R, Mei HC, Busscher HJ. Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions – its mechanisms and methods for study. FEMS Microbiology Reviews. 1999; 23(2): 179-230.
5. Baty AM, Suci P A, Tyler B J, Geesey GG. Investigation of mussel adhesive protein adsorption on polystyrene and polyoctadecyl methacrylate using angle dependent XPS, ATR- TIR and AFM. Journal of Colloid and Interface Science. 1996; 177(2): 307–15.
6. Potter A, Ceotto H, Giambiagi-Demarval M, dos Santos KR, Nes IF, Bastos Mdo C. The gene bap, involved in biofilm production, is present in Staphylococcus spp. strains from nosocomial infections. J Microbiol. 2009; 47(3): 319-26.
7. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbiol Biofilm . Ann Rev Microbiol. 1995;49:711-45.
8. Hanafy MS, Hatem ME. Studies on the antimicrobial activity of Nigella sativa seed (black cumini). J Ethnopharmacol. 1991; 34(2-3): 275-8.
9. Austin JW, Bergeron G. Development of bacterial biofilms in dairy processing lines. J Dairy Res. 1990; 62(3): 509-19.
10. Danese PN, Pratt LA, Kolter R. Biofilm formation as a developmental process. Methods Enzymol. 2001;336: 19–26.
11. Al-Saimary IE, Bakr SS, Jaffar T, Al-Saimary AE, Salim H, Al-Muosawi R, Effects of some plant extracts and antibiotics on Pseudomonas aeruginosa isolated from various burn cases. Saudi Med J. 2002; 23(7): 802-5.
12. Yadegarinia D, Gachkar L, Rezaei MB, Astanch SA, Rasooli I. Biochemical activities of Iranian Mentha piperita and Myrtus communis L. essential oils, Phytochemistry. 2006; 67(12): 1249-55.
13. Moussa AM, Emam AM, Mohamed MA, Diab YM. In vitro evaluation of some Egyptian plants against the rot bacteria and spider mite and isolation the active constituent(s) from Myrtus, communis leaves. International Food Research Journal. 2010; 17: 287-94. [Persian]
14. Teimouri M. Antimicrobial activity and essential oil composition of thymus daenensis celak from Iran. J Med Plant Res. 2012;6(4): 631-35.
15. Gandomi Nasrabadi H, Misaghi A, Akhund-Zadeh Basti A, Khosravi A, Bokaei S, Abbasifar A. Effect of thyme essential oil on Staphylococcus aureus growth in commercial soups. Quarterly herbs, 2008 ; 7(27): 45-51. [Persian]
16. Okoye LA. In Vitro Determination of Bactericidal Effects of Garlic (Allium sativum) on Staphylococcus aureus and Escherichia coli. Nigerian Journal of Science, Technology and Environmental Education (NIJOSTEE). 2010; 3(1): 152-6.
17. Majnooni M, Abiri R, Afanzade N, Malek Khatabi P. Study of Antibacterial Effects of Hydro - alcoholic

- Extract of 8 Medicinal Herbs Against Vancomycin Resistant *Staphylococcus aureus*. *J Med Plants*. 2012; 1 (41) :103-10. [Persian]
18. Alshami I, Alharbi AE. Hibiscus sabdariffa extract inhibits in vitro biofilm formation capacity of *Candida albicans* isolated from recurrent urinary tract infections. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2014; 4(2): 104–8.
  19. Namasivayam SK, Roy EA. Antibiofilm effect of medicinal plant extracts against clinical isolate of biofilm of *Escherichia coli*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2013; 5(2):486-9.
  20. Kim JE, Kim HE, Hwang JK, Lee HJ, Kwon Hk, Kim BI. Antibacterial characteristics of curcuma xanthorrhiza extract on *Streptococcus mutans* biofilm. *The Journal of Microbiology*. 2008; 46(2): 228-32.
  21. Hosseini F, Adlgostar A, Sharifnia F. Antibacterial Activity of *Pistacia atlantica* extracts on *Streptococcus mutans* biofilm . *International Research Journal of Biological Sciences*. 2013; 2(2): 1-7.



# Evaluation of the effect of antimicrobial activity of ethanol extract of *Myrtus communis*, *Zataria multiflora* Boiss and *Allium sativum* on biofilm formation by *Staphylococcus aureus*

**Zahra Sepehri.,**

Professor of Department of Internal Medicine, Dr, Faculty of Medicine, Zabol University of Medical Sciences, Iran

**Ali Akbar Nasiri.,**

Professor of Department of Anesthesiology, Dr, Faculty of Medicine, Zabol University of Medical Sciences, Iran

**Mehran Hesaraki.,**

Professor of Department of Pediatrics, Dr, Faculty of Medicine, Zabol University of Medical Sciences, Iran

**Fereshteh Javadian.,**

Master of Science in Development, Zabol Medicinal Plant Research Center, Zabol University of Medical Sciences, Iran

**Zohre Kiani.,**

Student of Medicine, Faculty of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Iran

**Ziba Fooladvand.,**

MSc in Biotechnology, Research and Technology Centre (Biocenter), National University of Zabol, Iran

Received:18/06/2014, Revised:20/07/2014, Accepted:27/07/2014

---

## Corresponding Author:

Fereshteh Javadian,  
Master of Science in Development,  
Zabol Medicinal Plant Research  
Center, Zabol University of  
Medical Sciences, Iran  
E-mail:  
fereshteh.javadian@yahoo.com

## Abstract

**Background and Purpose:** Development of antibiotic resistance among pathogenic bacteria motivates attempts to search for newer antimicrobial agents. In this research study, antibacterial effect of plant extract of *M. communis*, *Z. multiflora* and *Allium sativum* on biofilm formation by strains of *Staphylococcus aureus* resistant to the antibiotic were investigated.

**Methods and Materials:** 17 samples were separated from nose and throat of hospital and non-hospital personnels. The effect of extracts on biofilm formation by *S. aureus* and its resistant respect to the antibiotic were determined using a microplate 96.

**Results:** Effect of antibacterial extracts used at different concentrations showed that, despite the relative resistance of most strains at concentrations used, the maximum sensitivity was at concentrations of 1.25, 2.5 and 5 mg/ml of extracts and concentration of 10 mg/ml of the extract was considered as MBC. Bacterial growth was observed only at 24 hours and no biofilm was observed at any of the extracts.

**Conclusion :** Results showed that plant extracts can reduce biofilm formation by *Staphylococcus aureus* and, therefore, they can play an important role in reducing disease.

**Keywords:** *Plant extract, Biofilm, S. aureus, Antibiotic resistance.*