

Antimicrobial Activity of Extracts from *Satureja khuzistanica*, *Peganum harmala*, *Satureja sahendica* on Planktonic Growth and Biofilm Formation of *Staphylococcus aureus*

Elaheh Tasallot Maraghi¹, Nasim Kashef^{2*}, Ahmad Reza Gohari³, Zahra Fekrirad⁴

1. MSC in Microbiology, Department of Microbiology, School of Biology, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran
2. 2 Associate Professor in Medical Bacteriology, Department of Microbiology, School of Biology, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran
3. 3 Associate Professor, Medicinal Plants Research Center, Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4. 4 PhD in Microbiology, Department of Microbiology, School of Biology, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran

Received: 2020/02/19

Accepted: 2020/05/16

Abstract

Introduction: *Staphylococcus aureus* is one of the most important pathogenic bacteria in humans. Due to the antibiotic resistance, treatment of staphylococcal infections is difficult. Among the alternative treatment options, plants are considered as a rich source of material with antimicrobial activity. The aim of this study was to evaluate of the antimicrobial effects of ethyl acetatic, methanolic and water-methanolic extracts from *Satureja khuzistanica*, *Peganum harmala*, *Satureja sahendica* on planktonic growth and biofilm formation of *S. aureus*.

Materials and Methods: The extracts were prepared from different parts of plants and the antimicrobial properties of the extracts were determined by disk diffusion and microbroth dilution method. Also, Crystal violet staining assay was used to evaluate the ability to inhibit biofilm formation of *S. aureus* strains. Disruption of pre-formed biofilms of *S. aureus* strains were evaluated following exposure to plant extracts in different concentrations (ranging from 3/125 to 400mg/ml).

Results: The highest inhibitory zones were showed by ethyl acetatic extract of *Satureja sahendica* (28/6±0.6mm). Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of ethyl acetatic extract of *S.khuzistanica* were 1/562 and 3/125mg/ml, respectively. Besides, methanolic extract of *S. khuzistanica* was the most effective extract in inhibition of microbial cells attachment to surface (57/89%) and it showed disruption of pre-formed biofilms at the concentration of 50 mg/ml.

Conclusion: The extracts of all mentioned plants had satisfactory antimicrobial effects against the planktonic growth of *S. aureus* and methanolic extract of *S. khuzistanica* was effective against biofilm formation of *S. aureus*.

***Corresponding Author:** Nasim Kashef
Address: Associate Professor in Medical Bacteriology, Department of Microbiology, School of Biology, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran
Tel: 021-61113558
E-mail: kashefn@ut.ac.ir

Keywords: *Staphylococcus aureus*, Antibiotic resistance, Plant extracts, Antimicrobial activity, Biofilm

How to cite this article: Tasallot Maraghi E., Kashef N., Gohari A.R., fekrirad Z. Antimicrobial Activity of Extracts from *Satureja khuzistanica*, *Peganum harmala*, *Satureja sahendica* on Planktonic Growth and Biofilm Formation of *Staphylococcus aureus*, Journal of Sabzevar University of Medical Sciences, 2021; 28(4):556-568.

Introduction

Staphylococcus aureus is a commensal bacteria that colonizes the skin, and mucous membranes of the human body and biofilm formation by *S. aureus* isolates have been found in human skin lesions. Biofilm formation is a main virulence determinant in infection by *S. aureus* isolates and is one of the main sources of resistance.

Biofilm is a group of microorganisms that grows on living and non-living surfaces and surrounded by an extracellular matrix to provide an important barrier against the antibiotic therapies and immune system defense. Due to the reduced activity of antibiotics to eliminate the biofilm, it is one of the main problems in industry and medicine. Given the high prevalence of *S. aureus* in nosocomial infections and the failure of antibiotics in complete elimination of this pathogen, it is necessary to find alternative or complementary therapies.

Almost all nations and cultures have written some texts about plant extracts for medicinal use. Plants by producing a wide range of chemicals, in addition to having antimicrobial activity against planktonic cells, are able to weaken the biofilm through specific mechanisms.

Many studies have shown that medicinal plants contain coumarins, flavonoids, phenolics, alkaloids, terpenoids, tannins, essential oils, lectin, polypeptides, and polyacetylenes. These bioactive compounds are used as a starting point for antibiotics synthesis in order to treat infectious diseases. The crude extract of *Polygonum persicaria*, *Rumex hastatus*, *Rumex dentatus*, *Rumex nepalensis*, *Polygonum plebejum*, and *Rheum australe* have antibacterial and antifungal activities, inhibit the growth of *Citrobacter frundii*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, and *S. aureus*. In another study, the effect of ethyl acetate, methanol and water-methanol extracts of *Quercus brantii* on biofilm formation and biofilm disruption of *P. aeruginosa* were investigated. This study demonstrated that *Q. brantii* extracts had a good inhibitory effect on biofilm formation ability of *P. aeruginosa* and could eradicate preformed-biofilms in combination with N-acetylcystein.

This research was aimed to prepare ethyl acetate, methanol and water-methanol extracts of *Satureja khuzistanica*, *Peganum harmala*, *Satureja sahendica* and to evaluate activity of

these plant materials on planktonic growth and biofilm formation of *S. aureus*.

Methodology

Isolates

Staphylococcus aureus (ATCC 25923) and 9 clinical isolates were used in this study. Clinical isolates retrospectively collected from burn wound infections. The isolates were confirmed by University of Tehran Microorganisms Collection (UTMC) and received in skim milk culture. Then clinical strains were cultured onto nutrient agar plates and incubated at 37°C for 24h. Antibiotic susceptibility of isolates was examined by disk-diffusion method.

Preparation of plant material

Different parts of the plants were initially air-dried at room temperature and ground to a fine powder in a blender. The pulverized materials (1 g) were extracted by maceration using 10 mL ethyl acetate (EtOAc) to obtain crude EtOAc extract. The plant materials (1 g) were also extracted with 10 mL methanol (MeOH) to obtain crude MeOH extract. Same process was followed to prepare water-methanol (methanol: water, 1:1 v/v) extract. Furthermore, extracts were dried and concentrated under reduced pressure using a rotary evaporator to yield solid/semisolid residues. Stock solutions of crude extracts were prepared, filter-sterilized (0.45 µm) and stored at 4°C.

Minimum inhibitory concentration of the extracts

Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of ethyl acetate, methanol and water-methanol extracts of plants against *S. aureus* (ATCC 25923) was determined by micro-dilution method.

Evaluation of biofilm formation

Assessment of biofilm formation was performed using a microtitre plate assay according to Perez et al. Briefly, 1 ml of bacterial suspension (1 McFarland standard) was added to 2 ml of Trypticase Soy Broth (TSB) and incubated at 37°C for 24h. After incubation, the culture was vortexed and thereafter diluted 1:50 in fresh TSB, and 200 µl of this solution was incubated in 96-well flat-bottomed plates at 37°C for 24h. Media with suspended bacteria was then removed; the plates were carefully washed two

times with sterile phosphate buffer saline (pH 7.4). 200 μ l of 95% ethanol was added to each well and air-dried before staining with 200 μ l of 0.4% crystal violet solution for 15 min. After removing the dye solution and washing with water, the attached dye was solubilized with 10% acetic acid and the optical density at 492 nm was determined by a microtitre plate reader. TSB was used as a negative control (background absorbance). A biofilm-positive phenotype was defined as an optical density at 492 nm of ≥ 0.17 .

Inhibition of biofilm formation

The effect of different concentration ($\frac{1}{2}$ MIC, MIC and 2 MIC) of ethyl acetate, methanol and water-methanol extracts on biofilm formation ability was tested on polystyrene flat-bottomed microtitre plates. 1 ml of 1 McFarland standard suspension of the microorganisms was added to 2 ml of TSB and incubated for 24h at 37°C. After incubation, the stationary-phase culture was vortexed and there-after diluted 1:50 in fresh TSB, and 100 μ l of this solution was added into the wells in the presence of 100 μ l of each extract. Solvents were used as the negative controls. Following incubation, the biofilm biomass was assayed using the modified crystal violet staining assay, and the percentage inhibition was determined according to the following formula:

$$\text{Percentage inhibition} = \frac{(\text{OD Negative control} - \text{OD Experimental})}{(\text{OD Negative control})} \times 100$$

Evaluation of Minimum Biofilm Eradication Concentration (MBEC)

To test the ability of the extracts to disruption of preformed biofilms, biofilms were formed in 96 well microtitre plates by aliquoting 100 μ l of 1 McFarland suspension of *S. aureus* diluted 1:50 in TSB, into the wells. After adding 100 μ l fresh TSB, the plates were incubated for 24h at 37°C. Following incubation, supernatants were aspirated, and the wells were rinsed, with sterile phosphate buffer saline (PBS, pH=7.4) to remove non-adherent bacteria. Then, 200 μ l of ethyl acetate, methanol and water-methanol extracts (that showed some degree of inhibiting cell attachment) was diluted in TSB and added to a final concentration of 3.125-100 mg/ml in the wells. Culture medium was used as the positive control. The plates were further incubated for 24h at 37 °C. The biofilms were scraped carefully, and then vortexed for 30s to

homogenize the samples. Treated and untreated samples were serially diluted, plated on the nutrient agar plates, and incubated for 24h at 37°C. The MBEC was the lowest concentration of the extract at which 99.99% or more of the initial inoculum was killed.

Data analysis

Statistical analysis was carried out using SPSS Version 19.0. The values were expressed as mean \pm SD. One-way analysis of variance (ANOVA) was used to evaluate any significant differences between control and treated groups. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Result

Antibiotic susceptibility test

Among 9 clinical isolates, eight isolates showed complete resistance to amikacin, amoxicillin-clavulonate, ceftazidime, oxacillin, gentamicin and ciprofloxacin. UTMC 1474 was sensitive to amikacin, oxacillin and gentamicin.

Minimum inhibitory concentration of extracts

MIC values of ethyl acetate and methanol extracts of *S. khuzistanica* were 1.526, and 3.125 mg/ml, MIC values of ethyl acetate and water-methanol extracts of *S. sahendica* were 3.125 and 25 mg/ml, and MIC value of methanol extract of *P. harmala* was 6.25 mg/ml.

Evaluation of biofilm formation

S. aureus (ATCC 25923) and all clinical isolates had biofilm formation ability ($\text{OD} \geq 0.17$), but with different strength.

Inhibition of biofilm formation

Methanol extract of *S. khuzistanica* was found to be more effective in inhibiting biofilm formation ability of *S. aureus* than other extracts. All extracts in three concentrations ($\frac{1}{2}$ MIC, MIC and 2 MIC) showed some degree of inhibition. In most of cases, there were significant differences between treated and untreated groups ($p < 0.05$).

Evaluation of MBEC

The results showed that ethyl acetate and methanol extracts of *S. khuzistanica* were more effective in eradication of *S. aureus* preformed biofilms than other extracts.

Discussion

In the present study, the effect of ethyl acetate, methanol and water-methanol extracts of *S. khuzistanica*, *P. harmala*, *S. sahendica* on biofilm

formation and biofilm disruption of *S. aureus* were assessed. Our results indicated that ethyl acetate extract of *S. khuzistanica* was the most effective extract in killing of *S. aureus* isolates. Eftekhar et al. also showed that *S. khuzestanica* essential oil had strong antimicrobial activity against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*.

All extracts in three concentrations ($\frac{1}{2}$ MIC, MIC and 2 MIC) showed some degree of inhibition of biofilm formation ability of isolates. Methanol extract of *S. khuzistanica* was found to be the most effective extract (57.9% inhibition). Microbial cell adhesion and organization within a polysaccharide matrix is an important step in biofilm formation. Therefore, the ability of plant extracts to inhibit the cell adhesion can result in preventing biofilm formation. However, the mechanism of inhibition has not fully understood.

According to our results, ethyl acetate and methanol extract of *S. khuzistanica* were the most effective in eradication of *S. aureus* preformed biofilms. According to Skakeri et al. study, in the presence of biofilm barrier, the strains react to antimicrobial compounds based on the strength and thickness of their biofilms. So, concurrent use of

extract and the compounds increasing biofilm permeability provides quick and easy penetration of extract into the biofilm and facilitates the access of plant extract to the cells accumulated in the biofilm.

Conclusion

Our results show that methanol extract of *S. khuzistanica* had the most effective inhibitory effect on biofilm formation ability of *S. aureus* and could also eradicate preformed-biofilms. More understanding of the mechanism of action and the natural components of these extracts seems to be valuable.

Acknowledgements

This work was supported by the College of Science, University of Tehran.

Conflict of Interest

The authors hereby declare that they have no conflict of interest regarding the publication of this manuscript.

فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های *Satureja khozistanica*، *Peganum harmala* و *Satureja sahendica* بر رشد پلانکتونیک و تشکیل بیوفیلم باکتری *Staphylococcus aureus*

الهه تسلط مرقی^۱، نسیم کاشف^{۲*}، احمدرضا گوهری^۳، زهرا فکری راد^۴

۱. کارشناس ارشد میکروبیولوژی، بخش میکروبیولوژی، دانشکده زیست‌شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۲. دانشیار باکتری‌شناسی پزشکی، بخش میکروبیولوژی، دانشکده زیست‌شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۳. دانشیار، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۴. دکتری میکروبیولوژی، بخش میکروبیولوژی، دانشکده زیست‌شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۲/۲۷

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۱/۳۰

چکیده

* نویسنده مسئول: نسیم کاشف

نشانی: تهران - خیابان انقلاب - دانشگاه تهران - پردیس علوم - دانشکده زیست‌شناسی - بخش میکروبیولوژی

تلفن: ۶۱۱۳۵۵۸

دورنگار: ۶۶۴۹۲۹۹۲

رایانامه: kashefn@ut.ac.ir

شناسه ORCID:

0000-0002-8105-0231

شناسه ORCID نویسنده اول:

0000-0003-2609-9996

کلیدواژه‌ها:

Staphylococcus aureus

مقاومت آنتی بیوتیکی، عصاره-

های گیاهی، فعالیت

ضدمیکروبی، بیوفیلم

زمینه و هدف: *Staphylococcus aureus* یکی از عوامل مهم عفونت‌زا در انسان به‌شمار می‌رود. درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری به علت مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن با مشکلاتی مواجه است. در میان گزینه‌های درمانی جایگزین، گیاهان به‌عنوان منابع غنی از مواد دارای فعالیت‌های ضدمیکروبی مطرح هستند. هدف از مطالعه حاضر ارزیابی تأثیر ضدمیکروبی عصاره‌های اتیل استاتی، متانولی و آب متانولی گیاهان *Satureja khozistanica*، *Peganum harmala* و *Satureja sahendica* بر رشد پلانکتونیک و تشکیل بیوفیلم *S. aureus* بود.

مواد و روش‌ها: عصاره‌ها از قسمت‌های مختلف گیاهان موردنظر تهیه و خاصیت ضدمیکروبی عصاره‌ها به روش انتشار از دیسک و رقت‌سازی در مایع بررسی شد. توانایی مهار تشکیل بیوفیلم و تخریب بیوفیلم از پیش تشکیل شده سوبه‌های باکتریایی، پس از تیمار با غلظت‌های ۳/۱۲۵-۴۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره‌ها بررسی شد.

یافته‌ها: بیشترین قطر هاله عدم رشد مربوط به عصاره اتیل استاتی *Satureja sahendica* (۲۸/۶±۰/۶ میلی‌متر) بود. همچنین عصاره اتیل استاتی *Satureja khozistanica* دارای بالاترین اثر کشندگی و بازدارندگی رشد بر *S. aureus* بود؛ به طوری که حداقل غلظت مهارکنندگی رشد و حداقل غلظت کشندگی آن به ترتیب ۳/۱۲۵ و ۱/۵۶۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تعیین شد. همچنین عصاره متانولی *Satureja khozistanica* با میانگین درصد مهار ۵۷/۸۹ مؤثرترین عصاره در جلوگیری از اتصال سلول‌های میکروبی به سطح بود و در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر منجر به تخریب بیوفیلم از پیش تشکیل شده شد.

نتیجه‌گیری: عصاره‌های هر سه گیاه نامبرده دارای اثر کشندگی مطلوب بر *S. aureus* بودند و عصاره متانولی *Satureja khozistanica* دارای اثر کشندگی مطلوب بر بیوفیلم این باکتری بود.

۱. مقدمه

Staphylococcus aureus یکی از مهم‌ترین باکتری‌های بیماری‌زای انسانی با شیوع جهانی و امکان ایجاد عفونت در هر بافتی از انسان است. درمان مؤثر عفونت‌های استافیلوکوکی با ظهور مقاومت آنتی‌بیوتیکی با مشکل مواجه شده و منجر به افزایش استفاده از

آنتی‌بیوتیک‌های سطح‌آخر شده است [۱].

بسیاری از عفونت‌های انسانی با تولید بیوفیلم، در بدن انتشار پیدا می‌کنند یا از عفونت‌های اولیه مرتبط با بیوفیلم منشأ می‌گیرند [۲]. بیوفیلم، اجتماعی از سلول‌های میکروبی است که به سطوح زنده و غیرزنده متصل می‌شود. این اجتماعات میکروبی در مواد پلیمری خارج سلولی که ترکیبی از پروتئین‌ها، پلی‌ساکاریدها و

دریافت و بررسی شد. جدایه های بالینی با توجه به نتایج بررسی های مورفولوژیک و بیوشیمیایی به عنوان سویه های جنس *Staphylococcus* شناسایی شدند. سویه های مورد نظر در محیط نوترینت آگار به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شدند. الگوی حساسیت ضد میکروبی هر یک از سویه های بالینی نسبت به آنتی بیوتیک های آمیکاسین AN30، آموکسی سیلین - کلاولانات AMC30، سفنازیدیم CAZ30، آگراسیلین OX1، جنتامیسین GM10 و سیپروفلوکساسین CP5 (تهیه شده از شرکت پادتن طب) به روش انتشار از دیسک سنجیده شد [۸].

۲.۲. عصاره گیری از گیاهان

در این مطالعه از ۳ گیاه *Satureja khozistanica*، *Peganum harmala* و *Satureja sahendica* استفاده شد. عصاره های گیاه *Satureja sahendica* (اندام هوایی) به صورت آماده از بخش فارماکوگنوزی مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران در اختیار آزمایشگاه باکتری شناسی پزشکی قرار گرفت و عصاره های گیاه *Peganum harmala* (دانه)، *Satureja khozistanica* (اندام هوایی) و *Satureja sahendica* (ریشه) به روش خیساندن در حلال تهیه شدند. هر بار یوم دانشگاه شهید چمران اهواز، گیاه *Peganum harmala* را شناسایی و تأیید کرد. سایر گیاهان در بخش فارماکوگنوزی مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، شناسایی و تأیید شد. به منظور عصاره گیری، اندام های هوایی، ریشه و دانه گیاهان مذکور توسط دستگاه آسیاب برقی، پودر و خشک شد. عصاره گیری به روش خیساندن در حلال (اتیل استات، متانول و آب) انجام شد. پودر هر گیاه به ترتیب با حلال اتیل استات - متانول با نسبت جرمی - حجمی ۱:۱۰ (یک گرم پودر گیاهی در ده میلی لیتر حلال) و در مورد آب - متانول با نسبت ۱:۱ مخلوط شد و پس از ۲۴ ساعت، عمل جداسازی کامل حلال از عصاره توسط دستگاه *Rotary evaporator* صورت گرفت. پس از خشک شدن در زیر هود، عصاره ها در ویال های شیشه ای در یخچال نگهداری شدند. به منظور استریل کردن عصاره ها از فیلتر سرسرنگی ۰/۴۵ میکرومتر استفاده شد.

۲.۳. تعیین قطر هاله رشد نکردن باکتری

از سویه استاندارد *S. aureus* (ATCC ۲۵۹۲۳)، سوسپانسیون با کدورت نیم مک فارلند تهیه و روی محیط مولر هینیتون آگار کشت چمنی داده شد. رقت های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی گرم بر میلی - لیتر از عصاره های گیاهی تهیه شد. برای رقیق سازی عصاره ها از حلال های آن ها استفاده و با استفاده از دستگاه اولتراسونیک، محلول همگن حاصل شد. دیسک های استریل درون پلیت ها چیده شدند و ۴۰ میکرولیتر از هر عصاره روی یک دیسک ریخته شد. به عنوان

نوکلئیک اسیدها هستند، محصور می گردند و سد مهمی در مقابل درمان های آنتی بیوتیکی و دفاع سیستم ایمنی محسوب می شوند [۳]. ۸۰ درصد از عفونت های باکتریایی در انسان مرتبط با تشکیل بیوفیلم هستند [۴]. بیشتر مواد شیمیایی فقط در برابر میکروارگانیسم های غیر اتصال یافته و آزادی فعال هستند و نمی توانند به ساختار بیوفیلم نفوذ کنند. به منظور نفوذ و تخریب بیوفیلم ها، هیدرولیز کردن ساختار بیوفیلم ضروری است. محدود کردن رشد و توسعه عفونت های ایجاد شده توسط استافیلوکوکسی بسیار مهم است، اما ریشه کن کردن این عفونت ها به دلیل توانایی آن ها در شکل گیری بیوفیلم در انواع مختلف سطوح، معمولاً موفق نیست [۵]. بنابراین تلاش برای یافتن مواد ضد میکروبی جدید و قوی برای مقابله با معضلات ایجاد شده توسط میکروارگانیسم های مقاوم به چند دارو و تولید کننده بیوفیلم، ضروری است. به منظور مقابله با مقاومت های دارویی نوظهور، استفاده از گیاهان دارویی می تواند جایگزین مناسبی باشد. گیاهان، ترکیبات مختلفی را تولید می کنند که برای متابولیسم اولیه آن ها ضروری نیست اما توانایی تطبیقی گیاه برای زنده ماندن در شرایط نامطلوب را افزایش می - دهد. متابولیت های ثانویه گیاهان (همانند آلکالوئیدها، فنل ها، فلاونوئیدها، کینون ها، تانن ها، تربین ها و لکتین ها)، آن ها را در مقابل گیاهخواران و میکروب ها محافظت می کنند [۶]. اگرچه بسیاری از ترکیبات گیاهی مولکول هایی با محدوده اثر بخشی کم و ضعیف هستند اما می توانند روی هدف های متعدد بیوشیمیایی مؤثر باشند و موجب کاهش مقاومت گردند، در حالی که آنتی بیوتیک های رایج، فقط یک هدف را در باکتری نشانه گیری می کنند و اغلب دارای اثرات جانبی از جمله بروز مقاومت هستند. بنابراین سنتز ترکیبات مشابه عصاره های گیاهی با اثر بخشی بیشتر و سمیت کمتر می تواند هدفی جدید در طراحی داروهای گیاهی باشد. گیاهان علاوه بر فعالیت های ضد میکروبی علیه سویه های پلانکتونیک از طریق مکانیسم های اختصاصی، قادر به تضعیف بیوفیلم میکروبی هستند [۷]. بنابراین، هدف از این مطالعه، ارزیابی اثر عصاره های مختلف *Satureja khozistanica*، *Peganum harmala* و *Satureja sahendica* بر رشد پلانکتونیک و تشکیل بیوفیلم در سویه استاندارد و سویه های بالینی باکتری *S. aureus* بود.

۲. مواد و روش ها

۲.۱. سویه های باکتریایی

در این مطالعه از سویه استاندارد (ATCC ۲۵۹۲۳) *S. aureus* تهیه شده از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم های صنعتی ایران (PTCC) استفاده شد. همچنین ۹ جدایه بالینی جمع آوری شده از عفونت های حاد و مزمن زخم از مرکز کلکسیون میکروبی دانشگاه تهران

کنترل منفی، از اتیل استات، متانول و آب مقطر استفاده شد. پلیت‌ها به مدت ۱۸-۲۴ ساعت در دمای $37^{\circ}C$ سرماگذاری شدند و قطر هاله عدم رشد توسط خط‌کش اندازه‌گیری شد [۹].

۲.۴. تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد^۱ و حداقل غلظت کشندگی^۲ بر سویه استاندارد

حداقل غلظت مهارکنندگی رشد عصاره‌ها بر میکروارگانیسم با روش رقیق‌سازی در مایع محاسبه گردید. محلول ذخیره‌ای از عصاره گیاهی با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه شد. سوسپانسیون با کدورت نیم‌مک‌فارلند تهیه شد و به نسبت ۱:۱۰۰ به چاهک‌های حاوی محیط مولر هینتون برات اضافه گردید. با استفاده از محیط مولر هینتون برات غلظت‌های مختلف عصاره‌ها (۱۰۰ mg/ml - ۳/۱۲۵) تهیه شد و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های مختلف عصاره‌ها به هر چاهک اضافه شد. از میزان ۱۰۰ میکرولیتر از هر حلال به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد. نمونه‌های باکتریایی به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای $37^{\circ}C$ سرماگذاری شدند. پس از پایان زمان انکوباسیون، رشد باکتری درون چاهک‌ها به‌صورت چشمی بررسی شد و اولین چاهکی که فاقد کدورت بود، به‌عنوان MIC در نظر گرفته شد (۱۳). برای محاسبه حداقل غلظت کشندگی از چاهک‌های فاقد کدورت، ۱۰ میکرولیتر روی محیط جامد نوترینت آگار تلقیح شد و پلیت‌ها به مدت ۱۸-۲۴ ساعت در دمای $37^{\circ}C$ سرماگذاری شدند. سپس کمترین رقت از عصاره که فاقد رشد بود به‌عنوان MBC در نظر گرفته شد [۱۰].

۲.۵. آزمون مهار تشکیل بیوفیلم سویه‌های استاندارد و بالینی

سنجش توانایی تشکیل بیوفیلم در سویه‌ها به روش اسپکتروفتومتری با استفاده از رنگ کریستال ویوله انجام گرفت و سویه‌های باکتریایی از نظر تشکیل بیوفیلم در گروه‌های ضعیف، قوی و بسیار قوی قرار گرفتند. مقدار cutoff یا ODc به صورت $3 \times SD$ بالاتر از مقدار میانگین جذب چاهک‌های کنترل منفی (دارای محیط کشت به تنهایی) در نظر گرفته شد. چاهک‌های دارای $ODc < OD \leq 2 \times ODc$ در گروه بیوفیلم ضعیف، دارای $2 \times ODc < OD \leq 4 \times ODc$ در گروه بیوفیلم قوی و دارای $4 \times ODc < OD$ در گروه بیوفیلم بسیار قوی قرار گرفتند [۱۱]. از تمام سویه‌ها (یک سویه استاندارد و ۹ جدایه بالینی) سوسپانسیون با کدورت نیم‌مک‌فارلند در محیط تریپتون سوی برات (TSB) تهیه شد. سپس در تعدادی لوله استریل حاوی محیط TSB تازه، سوسپانسیون باکتریایی با نسبت ۱:۵۰

رقیق شد. از سوسپانسیون مربوط به هر سویه، ۱۰۰ میکرولیتر در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه ریخته شد (کنترل فاقد عصاره و کنترل حاوی حلال به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شدند). ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های مختلف عصاره (MIC، MIC ۱/۴ و MIC ۱/۲) در هر چاهک ریخته شد. پلیت‌ها به مدت ۱۸-۲۴ ساعت در انکوباتور $37^{\circ}C$ درجه قرار گرفتند. جذب نوری چاهک‌ها (OD) توسط دستگاه پلیت‌خوان (Elisa reader) در 490 نانومتر بررسی شد. با استفاده از فرمول زیر، درصد مهار بیوفیلم توسط غلظت‌های مختلف عصاره‌ها (100 mg/ml - $3/125$) محاسبه شد [۱۲].

$$\frac{\text{OD} \times 100 - \text{OD کنترل منفی}}{\text{OD کنترل منفی}}$$

۲.۶. تخریب و نابودی بیوفیلم از پیش تشکیل شده توسط عصاره‌های گیاهی

در این مرحله، بیوفیلم ۲۴ ساعته از سویه استاندارد و جدایه‌های بالینی در محیط TSB تشکیل شد. به این صورت که کشت ۲۴ ساعته باکتری با نسبت ۱ به ۱۰۰ در محیط TSB (glucose 0.2%) تلقیح شده و در پلیت ۹۶ خانه به میزان ۲۰۰ میکرولیتر ریخته شد. برای تشکیل بیوفیلم، پلیت در دمای $37^{\circ}C$ درجه به مدت ۲۴ ساعت سرماگذاری شد. پس از پایان زمان انکوباسیون، چاهک‌ها با بافر فسفات (Phosphate buffered saline) شستشو داده شدند. مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از رقت‌های مختلف عصاره (۱۰۰ mg/ml - ۳/۱۲۵) در چاهک‌ها ریخته شد (کنترل فاقد عصاره و کنترل حاوی حلال به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شدند). پلیت‌های ۹۶ خانه به مدت ۱۸-۲۴ ساعت در دمای $37^{\circ}C$ سرماگذاری شدند. پس از پایان زمان انکوباسیون، از هر چاهک کشت داده شد. پلیت‌ها به مدت ۱۸-۲۴ ساعت سرماگذاری شدند (دمای $37^{\circ}C$). رقتی از عصاره که در پلیت مربوط به آن، کلونی‌ای از باکتری مشاهده نشد، به‌عنوان رقت تخریب‌کننده بیوفیلم در نظر گرفته شد [۱۳].

۳. یافته‌ها

الگوی حساسیت هر یک از سویه‌های بالینی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آمیکاسین، آموکسی‌سیلین کلاولانات، سفنازیدیم، آگزاسیلین، جنتامیسین و سیپروفلوکساسین به روش انتشار از دیسک، سنجیده شد و نتایج به‌صورت حساس (S)، مقاوم (R) و نیمه‌حساس (I) در جدول ۱ نمایش داده شده است.

جدول ۱. الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های بالینی

(S: Sensitive, I: Intermediate, R: Resistance)

سیپروفلوکساسین	جنتامیسین	اگزاسیلین	سفتازیدیم	آموکسی سیلین - کلاوولانات	آمی‌کاسین	سویه باکتریایی
R	R	R	R	R	R	UTMC۱۴۳۹
R	R	R	R	R	R	UTMC۱۴۸۵
R	R	R	R	R	R	UTMC۱۴۴۶
R	R	R	R	R	R	UTMC۱۴۶۱
R	R	R	R	R	R	UTMC۱۴۵۱
R	R	R	R	R	R	UTMC۱۴۵۵
R	R	R	R	R	R	UTMC۱۴۴۲
R	S	S	R	R	S	UTMC۱۴۷۴
R	R	R	R	R	R	UTMC۱۴۷۸

khozistanica (۲۶/۳±۱/۱ میلی‌متر) و عصاره متانولی
Satureja sahendica (۲۲ میلی‌متر)، دارای بهترین اثر
بازدارندگی رشد بودند.

میانگین قطر هاله عدم رشد سویه (ATCC۲۵۹۲۳) *S. aureus*
در مجاورت انواع عصاره‌های گیاهی در جدول ۲ نشان
داده شده است. عصاره ایتیل‌استاتی *Satureja sahendica*
(۲۸/۶±۰/۶ میلی‌متر)، عصاره متانولی *Satureja*

جدول ۲. میانگین قطر هاله عدم رشد (ATCC۲۵۹۲۳) *S. aureus* در مجاورت عصاره‌های گیاهی

قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر)				حلال	عصاره‌های گیاهی (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)
۴۰۰	۲۰۰	۱۰۰	۵۰		
۲۸/۶±۰/۶	۲۹	۲۷/۳±۰/۶	۱۹±۱	ایتیل‌استات	<i>Satureja sahendica</i> (اندام هوایی)
۱۵/۶±۰/۶	۱۳±۱	۱۴/۳±۱/۱	۱۴/۶±۰/۶	ایتیل‌استات	<i>Satureja khozistanica</i> (اندام هوایی)
۷	۵	۰	۰	ایتیل‌استات	<i>Peganum harmala</i> (دانه)
۱۰	۹	۹	۸	ایتیل‌استات	<i>Satureja sahendica</i> (ریشه)
۲۶/۳±۱/۱	۱۷/۳±۰/۶	۱۵/۶±۰/۶	۱۴/۶±۰/۶	متانول	<i>Satureja khozistanica</i> (اندام هوایی)
۱۹/۳±۱/۱	۲۰/۳±۰/۶	۱۵	۱۱/۶±۱/۱	متانول	<i>Peganum harmala</i> (دانه)
۲۲	۲۱/۳±۰/۶	۲۱	۲۱±۱	آب متانول	<i>Satureja sahendica</i> (اندام هوایی)
۰	۰	۰	۰	آب متانول	<i>Satureja khozistanica</i> (اندام هوایی)
۱۳	۱۰	۷/۶±۰/۶	۷	آب متانول	<i>Peganum harmala</i> (دانه)

۳/۱۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. پس از آن عصاره
متانولی *Satureja khozistanica* با $MIC = ۳/۱۲۵$ و $MBC = ۶/۲۵$
 $MBC =$ و ایتیل‌استاتی *Satureja sahendica* با
 $MIC = MBC = ۳/۱۲۵$ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، در رتبه‌های
بعدی قرار می‌گیرند. عصاره‌هایی که دارای کمترین مقدار
 MIC بودند به‌عنوان عصاره‌های برتر در آزمایش‌های بعدی مورد استفاده
قرار گرفتند.

۳.۱. حداقل غلظت مهارکننده رشد (MIC) و حداقل
غلظت کشنده (MBC) عصاره‌های گیاهی برتر بر سویه
S. aureus (ATCC۲۵۹۲۳)
MIC و MBC عصاره‌های گیاهی دارای بالاترین قطر هاله عدم
رشد، در جدول ۳ بیان شده است. عصاره ایتیل‌استاتی *Satureja*
khuzistanica دارای بالاترین اثر کشندگی و بازدارندگی رشد
بر *S. aureus* بود و MIC و MBC آن به‌ترتیب ۱/۵۶۲ و

جدول ۳. حداقل غلظت مهارکننده رشد و حداقل غلظت کشنده عصاره‌های گیاهی بر تر بر سویه *ethy S. aureus* (ATCC۲۵۹۲۳)

عصاره‌های گیاهی	حداقل غلظت مهارکننده رشد (میلی گرم بر میلی لیتر)	حداقل غلظت کشنده (میلی گرم بر میلی لیتر)
عصاره اتیل استاتی <i>Satureja khozistanica</i>	۱/۵۶۲	۳/۱۲۵
عصاره متانولی <i>Satureja khozistanica</i>	۳/۱۲۵	۶/۲۵
عصاره اتیل استاتی <i>Satureja sahendica</i>	۳/۱۲۵	۳/۱۲۵
عصاره متانولی <i>Peganum harmala</i>	۶/۲۵	۶/۲۵
عصاره آب متانولی <i>Satureja sahendica</i>	۲۵	۲۵

۳.۲. توانایی تشکیل بیوفیلم سویه‌ها

همه سویه‌های موردآزمون، توانایی تشکیل بیوفیلم را داشتند (جدول ۴). در این میان، سویه بالینی UTMC۱۴۵۱ دارای

بیوفیلم ضعیف، سویه‌های UTMC۱۴۴۲ و UTMC۱۴۴۶ دارای بیوفیلم قوی و سایر سویه‌ها دارای بیوفیلم متوسط ارزیابی شدند.

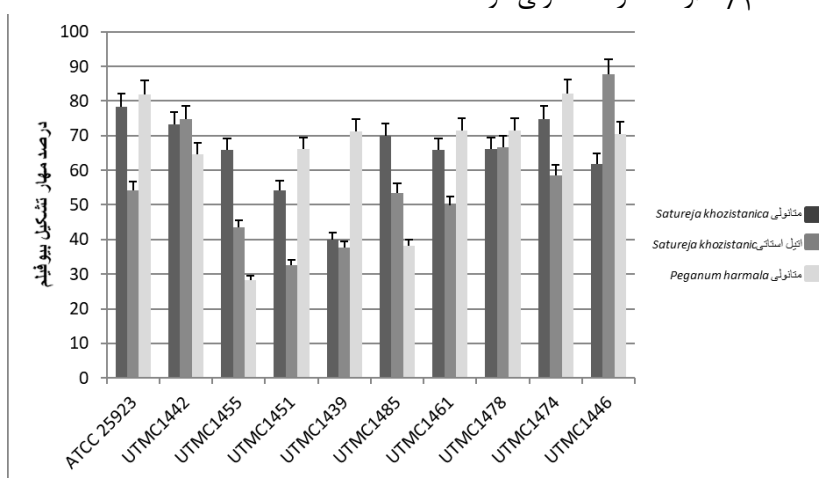
جدول ۴. میانگین جذب نوری هر سویه پس از تشکیل بیوفیلم در ۴۹۰ nm

سویه باکتریایی	میانگین جذب نوری در ۴۹۰nm	سویه باکتریایی	میانگین جذب نوری در ۴۹۰nm
ATCC۲۵۹۲۳	۱/۴۳۵	UTMC۱۴۵۱	۰/۶۸۷
UTMC۱۴۳۹	۱/۱۷۵	UTMC۱۴۵۵	۱/۶۰۹
UTMC۱۴۸۵	۱/۱۱۲	UTMC۱۴۴۲	۲/۸۸
UTMC۱۴۴۶	۲/۰۶	UTMC۱۴۷۴	۰/۹۵۶
UTMC۱۴۶۱	۱/۱۷۳	UTMC۱۴۷۸	۱/۰۱۸

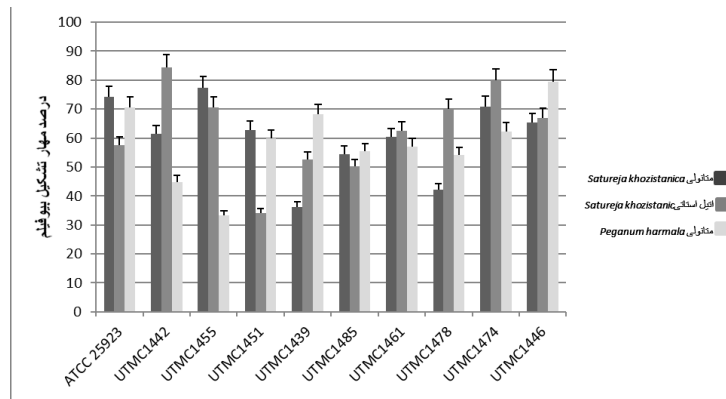
۳.۳. درصد مهار تشکیل بیوفیلم در سویه‌های استاندارد

و بالینی *S. aureus* در حضور عصاره‌های گیاهی بر تر عصاره‌هایی که در مرحله انتشار از دیسک، قطر هاله بهتری داشتند، در این بخش انتخاب و مطالعه شدند. میانگین درصد مهار تشکیل بیوفیلم سویه‌های *S. aureus* در غلظت‌های MIC، $1/4$ MIC و $1/2$ از عصاره متانولی و

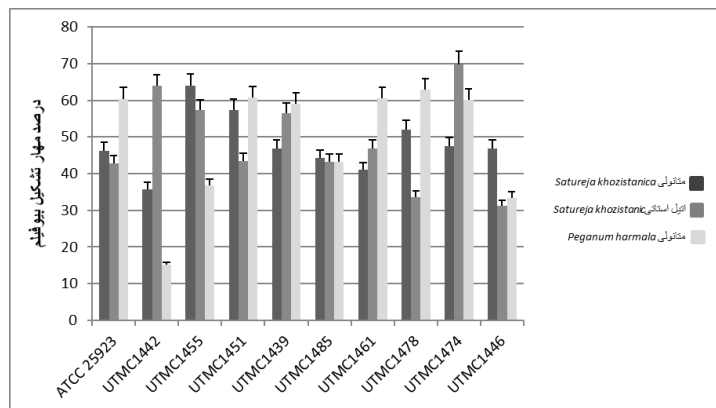
اتیل استاتی *Satureja khozistanica* و متانولی *Peganum harmala* در نمودارهای ۱، ۲ و ۳ نشان داده شده است. عصاره متانولی *Satureja khozistanica* با میانگین درصد مهار $57/89$ مؤثرترین عصاره در جلوگیری از اتصال سلول‌های میکروبی به سطح بود.



نمودار ۱. درصد مهار تشکیل بیوفیلم سویه‌های بالینی و استاندارد *S. aureus* حاصل از عصاره‌های متانولی *Satureja khozistanica*، اتیل استاتی *Satureja khozistanica* و متانولی *Peganum harmala* در غلظت MIC از هر عصاره



نمودار ۲. درصد مهار تشکیل بیوفیلم سویه‌های بالینی و استاندارد *S. aureus* حاصل از عصاره‌های متانولی *Satureja khozistanica*، اتیل‌استاتی *Satureja khozistanica* و متانولی *Peganum harmala* در غلظت MIC $1/2$ از هر عصاره



نمودار ۳. درصد مهار تشکیل بیوفیلم سویه‌های بالینی و استاندارد *S. aureus* حاصل از عصاره‌های متانولی *Satureja khozistanica*، اتیل‌استاتی *Satureja khozistanica* و متانولی *Peganum harmala* در غلظت MIC $1/4$ از هر عصاره

عصاره‌های گیاهی برتر در جدول ۵ نمایش داده شده است. عصاره‌های اتیل‌استاتی و متانولی *Satureja khozistanica* بیشترین توانایی تخریب بیوفیلم را در غلظت‌های پایین از خود نشان دادند.

۳.۴. تخریب بیوفیلم تشکیل شده سویه‌های استاندارد و بالینی *S. aureus* در حضور عصاره‌های گیاهی برتر
نتایج حاصل از تخریب بیوفیلم از پیش تشکیل شده در حضور

جدول ۵. غلظت عصاره‌های گیاهی برتر تخریب‌کننده بیوفیلم سویه‌های استاندارد و بالینی *S. aureus*

Satureja khozistanica متانولی (میلی گرم بر میلی لیتر)	Satureja khozistanica اتیل استاتی (میلی گرم بر میلی لیتر)	Peganum harmala متانولی (میلی گرم بر میلی لیتر)	سویه باکتری <i>S. aureus</i>
۵۰	۵۰	۵۰	ATCC۲۵۹۲۳
۵۰	۵۰	۴۰	UTMC۱۴۸۵
۵۰	۱۰۰	۴۰	UTMC۱۴۴۶
۵۰	۱۰۰	۴۰	UTMC۱۴۶۱
۲۵	۵۰	۴۰	UTMC۱۴۵۱
۲۵	۵۰	۴۰	UTMC۱۴۵۵
۱۰۰	۱۰۰	۴۰	UTMC۱۴۴۲
۲۵	۵۰	۲۰	UTMC۱۴۷۴
۲۵	۵۰	۴۰	UTMC۱۴۷۸
۲۵	۵۰	۲۰	UTMC۱۴۳۹

۴. بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه، فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های گیاهان *Satureja khozistanica*، *Peganum harmala* و *Satureja sahendica* بر رشد پلانکتونیک و تشکیل بیوفیلم سویه استاندارد و سویه‌های بالینی باکتری *S. aureus* بررسی شد. در بررسی قطر هاله عدم رشد، بالاترین میزان اثر بازدارندگی به ترتیب به *Satureja sahendica* (اتیل‌استات) و *Satureja khozistanica* (متانول) تعلق داشت. نتایج به دست آمده نشان داد در اغلب عصاره‌های گیاهی مورد مطالعه، ارتباطی مستقیم بین غلظت عصاره و اثر ضد میکروبی وجود داشت؛ به طوری که در مورد عصاره متانولی *Peganum harmala* با افزایش غلظت عصاره، از غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، در قطر هاله عدم رشد، کاهش مشاهده شد.

نتایج به دست آمده نشان داد که عصاره اتیل‌استاتی *Satureja khozistanica* با میزان MIC و MBC به ترتیب ۱/۵۶۲ و ۳/۱۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، بالاترین اثر کشندگی و بازدارندگی رشد بر *S. aureus* را داشت. در مطالعه افتخار و همکارانش (۲۰۱۷) فعالیت ضد باکتریایی عصاره گیاه *Satureja khozistanica* علیه سویه‌های مقاوم به داروی باکتری *Acinetobacter baumannii* بررسی شد. نتایج نشان‌دهنده فعالیت ضد باکتریایی قوی این عصاره علیه تمام سویه‌های بالینی بود؛ به طوری که قطر هاله عدم رشد (۲۹-۴۲ میلی‌متر) و MIC = ۰/۳۱ و MBC = ۰/۶۲-۰/۳۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود [۱۴].

بر اساس نتایج به دست آمده، همه عصاره‌های گیاهی در سه غلظت به کار رفته، در کاهش کلونیزاسیون میکروبی و مهار تشکیل بیوفیلم موفق عمل کردند و در بیشتر موارد، کلونیزاسیون میکروبی را حداقل ۵۰ درصد کاهش دادند. در تعدادی از موارد، MIC عصاره دارای بالاترین میزان مهار بیوفیلم بود و با افزایش غلظت عصاره، افزایش درصد مهار بیوفیلم مشاهده می‌شد و در مواردی غلظت MIC ۱/۲ و حتی MIC ۱/۴ دارای بالاترین میزان مهار بیوفیلم بود و رابطه مشخصی بین غلظت عصاره و درصد مهار بیوفیلم وجود نداشت. عصاره متانولی *Satureja khozistanica* با میانگین درصد مهار ۵۷/۸۹ موثرترین عصاره در جلوگیری از اتصال سلول‌ها بود. سپس عصاره اتیل‌استاتی *Satureja khozistanica* با میانگین مهار ۵۷/۴۳ درصد و عصاره متانولی *Peganum harmala* با درصد مهار ۵۵/۸۸ در رتبه‌های بعدی قرار گرفتند. موفقیت عصاره‌ها در مهار اتصال سلول‌ها، پتانسیل بالای آنها را در کاهش کلونیزاسیون میکروبی به سطح که منجر به عفونت می‌گردد، بیان می‌کند. مکانیسم اثر عصاره بر مهار اتصال نامشخص است اما می‌تواند ناشی از تأثیر عصاره بر ترکیب اسیدهای چرب غشای سلول و آب‌گریزی سطح سلول باشد. از آنجا که اتصال

سلول‌ها به سطح به وسیله نیروی آب‌گریزی سطح تسهیل می‌شود، احتمالاً عصاره‌های گیاهی منجر به تغییر قابل توجه در رفتار سطح و در نتیجه تأثیر در میزان جذب ترکیبات آب‌دوست/آب‌گریز می‌شوند. عصاره‌ها تنها غشای باکتری را تحت تأثیر قرار نمی‌دهند بلکه آنزیم‌های دخیل در متابولیسم سلول نیز ممکن است تحت اثر عصاره فعال شده و قادر به تغییر آب‌گریزی سطح باشند [۱۳].

تخریب بیوفیلم سویه‌های استاندارد و بالینی با غلظت‌های متفاوتی از عصاره‌های اتیل‌استاتی و متانول *Satureja khozistanica* انجام گرفت؛ به طوری که عصاره‌ها در مقابل بیوفیلم بسیار قوی مربوط به سویه UTMC ۱۴۴۲ با OD=۲/۸۸ و سویه ۱۴۴۶ UTMC با OD=۲/۰۶ اثری ضعیف و در مقابل بیوفیلم قوی و متوسط بقیه سویه‌ها قدرت تخریب بیشتری را از خود نشان دادند. در صورت وجود سد بیوفیلم در مقابل عصاره، سویه‌ها با توجه به توانایی تشکیل بیوفیلم خود به عصاره واکنش نشان می‌دهند. هرچه ضخامت بیوفیلم بیشتر باشد؛ دسترسی عصاره به سلول‌های موجود در بخش‌های عمقی‌تر دشوارتر خواهد بود [۱۵]. در صورت استفاده همزمان عصاره با ترکیباتی که موجب نفوذپذیری بیوفیلم می‌شوند، سد بیوفیلم از میان برداشته و سویه‌ها در حالت پلانکتونیک با عصاره مواجه می‌گردند. در این صورت، واکنش سویه‌های باکتریایی به عصاره با توجه به وجود مکانیسم‌های مقاومت در آن‌ها متغیر خواهد بود [۱۶].

در مطالعه کاشف و همکاران (۲۰۱۷)، اثر عصاره گیاه *Quercus brantii* (بلوط ایرانی) بر تولید بیوفیلم چندین سویه از باکتری *Pseudomonas aeruginosa* بررسی شد. نتایج این پژوهش نشان داد که عصاره اتیل‌استاتی *Quercus brantii* تشکیل بیوفیلم *P. aeruginosa* را بیش از ۷۰ درصد مهار می‌کند. پس از آن عصاره با حلال متانول در آب (۶۶-۵۲ درصد مهار) و متانولی (۵۷-۴۴ درصد مهار) قرار داشتند. عصاره متانول در آب *Quercus brantii*، در ریشه‌کن کردن بیوفیلم از پیش تشکیل شده *P. aeruginosa* مؤثرتر بود [۱۷].

در مطالعه محسنی‌پور و همکاران (۲۰۱۶) اثر ضد میکروبی عصاره‌های گیاه *Peganum harmala* بر حالت پلانکتونی و ساختارهای بیوفیلم ۶ باکتری بیماری‌زا بررسی شد. عصاره‌ها در مهار رشد باکتری‌ها پلانکتونی، مهار تشکیل بیوفیلم و تخریب ساختارهای بیوفیلمی مؤثر بودند و غلظت هر عصاره رابطه مستقیم با اثربخشی آن داشت. تیمار جنس استافیلوکوکوسی بیشترین مهار تشکیل بیوفیلم (۲۸/۹۰ درصد) و تیمار باکتری *Streptococcus pneumoniae* بیشترین تخریب ساختار بیوفیلمی (۷۷/۷۶ درصد) را به همراه داشت [۱۸]. حضور ماده پلیمری خارج سلولی که احاطه‌کننده سلول‌های بیوفیلم است، مانند یک سد فیزیکی مانع انتشار کامل عصاره به قسمت‌های درونی بیوفیلم می‌شود. همچنین

جایگزینی آنتی‌بیوتیک‌ها را داشته باشند. همچنین درک بیشتر از مکانیسم عمل این عصاره‌ها می‌تواند در راستای تولید مواد سنتزی شیمیایی با ساختار و عملکرد مناسب، سودمند باشد.

تشکر و قدردانی

این کار با حمایت بخش میکروبیولوژی دانشکده زیست‌شناسی دانشگاه تهران و همکاری مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شده است.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تعارض منافی در این پژوهش وجود نداشته است.

ممکن است پمپ‌های efflux منجر به خروج عوامل ضد میکروبی شوند [۱۹]. در مطالعه حاضر، عصاره متانولی Peganum harmala، قادر به تخریب بیوفیلیم در غلظت‌های بالا بود. بنابراین استفاده از این عصاره برای تخریب بیوفیلیم، به ترکیباتی نیاز دارد که نفوذپذیری بیوفیلیم را نسبت به آن افزایش دهند. نتایج ما نشان داد که تمام عصاره‌ها در غلظت‌های مورد استفاده در این مطالعه می‌توانند توانایی تشکیل بیوفیلیم در باکتری *S. aureus* را با درصد بالایی مهار کنند. چسبندگی سلول و سازماندهی در یک ماتریس پلی‌ساکارید، گامی مهم در تشکیل بیوفیلیم است [۱۲]. بنابراین، توانایی عصاره‌های گیاهی در مهار چسبندگی سلول می‌تواند منجر به جلوگیری از تشکیل بیوفیلیم میکروبی شود. تحقیقات بیشتر برای یافتن جزء مؤثر عصاره‌هایی با عملکرد مناسب می‌تواند منجر به یافتن مواد ضد میکروبی مؤثری گردد که پتانسیل

References

- [1]. Lee AS, de Lencastre H, Garau J, Kluytmans J, Malhotra-Kumar S, Peschel A, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nature reviews Disease primers*. 2018;4(1):1-23.
- [2]. Otto M. *Staphylococcal biofilms*. *Gram-Positive Pathogens*. 2019;699-711.
- [3]. Landini P, Antoniani D, Burgess JG, Nijland R. Molecular mechanisms of compounds affecting bacterial biofilm formation and dispersal. *Applied microbiology and biotechnology*. 2010;86(3):813-23.
- [4]. Quave CL, Estévez-Carmona M, Compadre CM, Hobby G, Hendrickson H, Beenken KE, et al. Ellagic acid derivatives from *Rubus ulmifolius* inhibit *Staphylococcus aureus* biofilm formation and improve response to antibiotics. *PloS one*. 2012;7(1)
- [5]. Bazargani MM, Rohloff J. Antibiofilm activity of essential oils and plant extracts against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms. *Food control*. 2016;61:156-64.
- [6]. Stefanovic O, Comic L. Synergistic antibacterial interaction between *Melissa officinalis* extracts and antibiotics. *Journal of applied pharmaceutical science*. 2012;2(1):1.
- [7]. Simoes M, Bennett RN, Rosa EA. Understanding antimicrobial activities of phytochemicals against multidrug resistant bacteria and biofilms. *Natural product reports*. 2009;26(6):746-57.
- [8]. Wayne P. PERFORMANCE STANDARDS FOR ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING, NINTH INFORMATIONAL SUPPLEMENT. 2008.
- [9]. Seyyednejad SM, Koochak H, Darabpour E, Motamedi H. A survey on *Hibiscus rosa-sinensis*, *Alcea rosea* L. and *Malva neglecta* Wallr as antibacterial agents. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 2010;3(5):351-5.
- [10]. Darabpour E, Motamedi H, Nejad SMS. Antimicrobial properties of *Teucrium polium* against some clinical pathogens. *Asian pacific journal of tropical medicine*. 2010;3(2):124-7.
- [11]. Darabpour E, Kashef N, Mashayekhan S. Chitosan nanoparticles enhance the efficiency of methylene blue-mediated antimicrobial photodynamic inactivation of bacterial biofilms: An in vitro study. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*. 2016;14:211-7.
- [12]. El Abed S, Houari A, Latrache H, Remmal A, Koraichi SI. In vitro activity of four common essential oil components against biofilm-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Research Journal of Microbiology*. 2011;6(4):394.
- [13]. Sandasi M, Leonard C, Van Vuuren S, Viljoen A. Peppermint (*Mentha piperita*) inhibits microbial biofilms in vitro. *South African Journal of Botany*. 2011;77(1):80-5.
- [14]. Eftekhari F, Ashoori N, Yousefzadeh M. In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of *Satureja khuzestanica* Jamzad essential oils against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. 2017.
- [15]. Roberts ME, Stewart PS. Modelling protection from antimicrobial agents in biofilms through the formation of persister cells. *Microbiology*. 2005;151(1):75-80.
- [16]. Jabra-Rizk M, Meiller T, James C, Shirliff M. Effect of farnesol on *Staphylococcus aureus* biofilm formation and antimicrobial susceptibility. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2006;50(4):1463-9.
- [17]. Kashef N, Seyyedi ZS, Gohari AR. In vitro activity of *Quercus brantii* extracts against biofilm-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Progress in Biological Sciences*. 2017;7(1):31-8.
- [18]. Mohsenipour Z, Hassanshahian M. Antibacterial activity of *Espanol* (*Peganum harmala*) alcoholic extracts against six pathogenic bacteria in planktonic and biofilm forms. 2016.
- [19]. Sandasi M. The effect of plant extracts on microbial biofilm formation and development. 2008.