Arch

مجله دانشکده علوم پزشکی نیشابور

www.journalnums.ac.ir

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 11:31 IRDT on Saturday July 13th 2019

اثر ضد بیوفیلمی عصاره نعناع بر روی باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* جدا شده از بیماران بستری شهرستان تبریز

پریا وقری[1]، سید منصور آل طه[1و2*]

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده تحصیلات تکمیلی، واحد بناب، دانشگاه آزاد اسلامی، بناب، ایران

۲- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

مقاله پژوهشی اصیل

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۸/۱۳

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۱/۱۳

***نویسنده مسئول:** سید منصور آل طه، بناب، بلوار لاله، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بناب، دانشکده تحصیلات تکمیلی، گروه زیست شناسی

تلفن: ۰۴۱۳۷۷۳۸۸۹۳

پست الکترونیک:

manal239@yahoo.com

چکیده

مقدمه

بیوفیلم‌ها ممکن است بر روی سطوح زنده یا غیر زنده تشکیل شوند و در محیط طبیعی، صنعتی و بیمارستان شایع باشند. *سودوموناس آئروژینوزا* عامل پاتوژنیک بوده و پتانسیل بالایی برای تشکیل بیوفیلم دارد. تحقیق در مورد داروهای گیاهی برای مقابله با بیوفیلم از اهمیت خاصی برخوردار است. هدف از این تحقیق تعیین اثر عصاره نعناع بر روی باکتری و بیوفیلم جدایه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* و تعیین فراوانی ژن *pelF* و ارتباط آن با تشکیل بیوفیلم می‌باشد.

مواد و روش‌ها

۲۰۸ سویه بالینی جمع‌آوری شد. بعد از عصاره‌گیری تاثیر آن بر روی رشد *سودوموناس آئروژینوزا* بررسی گردید و مقدار MIC و MBC عصاره نعناع تعیین شد. زمان مناسب و شدت تشکیل بیوفیلم به صورت ضعیف، متوسط و قوی سنجیده شد و کمترین غلظت مهار بیوفیلم توسط عصاره نعناع (BIC) تعیین گردید. سپس حضور ژن *pelF* توسط PCR بررسی شد.

یافته‌ها

عصاره نعناع باعث تشکیل هاله عدم رشد بر روی باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* گردید و غلظت MIC و MBC عصاره نعناع به ترتیب ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر تعیین شد. زمان مناسب تشکیل بیوفیلم ۴۸ ساعت تعیین گردید و کمترین غلظت مهار بیوفیلم توسط عصاره نعناع ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر به دست آمد. صد درصد نمونه‌های جدا شده دارای ژن *PelF* بودند و این ژن رابطه معنی‌داری با تشکیل بیوفیلم نشان داد (۰/۰۰۰۱ =*P*).

نتیجه‌گیری

احتمالا می‌توان از عصاره نعناع در ترکیبات مختلف برای مهار باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* و مهار تشکیل بیوفیلم آن استفاده کرد.

کلیدواژه‌ها

سودوموناس آئروژینوزا، بیوفیلم، عصاره نعناع ، ژن *PelF*، PCR

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 11:31 IRDT on Saturday July 13th 2019

مقدمه

پزشکی مدرن طی قرن اخیر با پیشرفت عظیمی روبرو بوده است. با این حال طب سنتی بدلایل مختلفی با بکارگیری گیاهان دارویی موقعیت خیلی مهمی در زندگی بسیاری از مردم سراسر جهان را به خود اختصاص داده است. در واقع بیش از ۲۵ هزار نوع گیاه در کتب داروسازی استفاده شده و بیش از ۵۰ درصد محصولات دارویی موجود در بازار منشاء گیاهی دارند (۱).

بیوفیلم مجموعه‌ای از سلول‌های میکروبی است که بطور برگشت ناپذیر با یک ماتریکسی از مواد ، عمدتا" پلی ساکاریدی در روی یک سطح بهم متصل شده‌اند (که با شستشوی ملایم حذف نمی‌شوند). به عبارتی دیگر بیوفیلم‌ها ساختار پیچیده‌ای هستند که ذرات مختلفی از میکروارگانیسم‌ها در یک ماتریکس اگزوپلی ساکاریدی[۱] محاط شده‌اند (۲) درون بیوفیلم، باکتری‌ها قادر هستند که از طریق سیستم غذایی کوروم سنسینگ[۲] باهم ارتباط برقرار کنند (۳). بیوفیلم‌ها به مواد ضدعفونی کننده یا دترجنت‌ها مقاومت نشان می‌دهند که این امر باعث بروز مشکلاتی در بیشتر زمینه‌هایی مثل صنایع غذایی و پزشکی گردیده است (۴).

در طبیعت میکروارگانیسم‌ها اغلب در ارتباط نزدیکی با سطوح جامد رشد می‌کنند که این سطوح ممکن است بافت‌های نرم زنده و یا سطوح غیر زنده، مواد غوطه‌ور و یا ذرات خاک باشد. ارتباط و پیوستگی با سطوح جامد منجر به تشکیل بیوفیلم میکروبی می‌گردد. تشکیل بیوفیلم منافع زیادی از جمله حفاظت آنها در برابر سیستم ایمنی میزبان، مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها و ضد عفونی کننده‌ها، حفظ و نگهداری محیط فیزیکی- شیمیایی مناسب برای رشد و بقاء میکروارگانیسم، برای ارگانیسم متشکله دارد. بنابراین آنها قادرند در شرایط نامساعد مقاومت کرده و به حیات خود ادامه دهند(۵).

یکی از مهمترین پیشرفت‌ها در پزشکی مدرن استفاده از وسایل ساخته شده در پیونددهی موقت و دائم است. امروزه در بیشتر درمان‌های پزشکی و جراحی از سوندها، لوله‌ها و ابزارهای پزشکی کاشتنی استفاده می‌گردد. مهمترین مشکل استفاده از این وسایل ایجاد عفونت بیوفیلم میکروبی است. بیوفیلم‌ها در عفونت بافت آندوکاردیت، عفونت نازوفارنکسی، عفونت دندان و لثه، عفونت با ابزار پزشکی کاشتنی مثل سوند و پروتزها یافت می‌شوند. بیمارانی که احتیاج به سوندگذاری طولانی مدت دارند به طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها از جمله سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* ی مقاوم به آنتی-بیوتیک و مولد بیوفیلم، انتروباکتر[۳]، پروتئوس (Proteus) مبتلا می‌گردند. نتایج به دست آمده در زمینه تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی *سودوموناس آئروژینوزا* ی جدا شده از زخم سوختگی نشان می‌دهد که به سختی می‌توان آنتی بیوتیکی را بدون دغدغه مقاومت به این باکتری، به کار برد. بررسی انجام شده حاکی از آن است که اگرچه بعضی از آنتی بیوتیک‌ها هنوز تاثیر نسبتا خوبی بر *سودوموناس آئروژینوزا* دارند ولی برخی دیگر عملا از دایره کاربرد خارج شده و یا به زودی خارج خواهند شد (۶). هر چند عمده‌ترین علت مقاومت دارویی را به وجود ژن‌های قابل انتقال نسبت داده‌اند اما نباید از نظر دور داشت که فشار انتخابی ناشی از استفاده گسترده از آنتی بیوتیک‌ها به گزینش باکتری‌های با مقاومت چند دارویی می‌انجامد. در این راستا استفاده از گیاهان دارویی با خاصیت ضدمیکروبی اهمیت پیدا می‌کند. از بین این گیاهان، گیاه نعناع دارای خواص ضد میکروبی می‌باشد (۷).

[۱] Exopolysaccharides

[۲] Quorum sensing

[۳] Enterobacter

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 11:31 IRDT on Saturday July 13th 2019

استفاده از گیاهان در پزشکی به هزاران سال پیش برمی‌گردد و تاکنون نیز ادامه دارد. تعداد کثیری از گیاهان برای درمان بیماری‌ها استفاده می‌شود و بیشتر آنها دارای خواص ضد میکروبی هستند (۸). از گیاهانی که در زمینه طب سنتی حائز اهمیت است و به خاطر خواص زیادی که دارد در میان گیاهان دارویی خوب شناخته شده‌است، گیاه نعناع می‌باشد. گیاه نعناع با نام علمی *Mentha piperta* به نام مستعار peppermint شناخته می‌شود که بومی اروپا و خاورمیانه می‌باشد (۹). این گیاه به خانواده لامیاسه[۱] تعلق دارد و از لحاظ پزشکی حائز اهمیت می‌باشد. خانواده لامیاسه گیاهان معطری هستند که در زمان قدیم در طب سنتی به عنوان افزایش دهنده عمر مواد غذایی استفاده می‌شده است (۱۰). گیاه نعناع در مناطق معتدلی چون آمریکا، آسیا و اروپا کشت داده می‌شود (۱۱). گیاه نعناع فعالیت بازدارنگی در مقابل باکتری‌ها، قارچ‌ها و مخمرها را دارد (۷) که می‌توان به خاصیت ضد باکتریایی آن در مقابل باکتری‌هایی چون *استافیلوکوکوس اورئوس*[۲]، سالمونلا *تیفی موریم*[۳]، *اشریشیاکلی*[۴]، *لیستریا مونوسیتوژن*[۵] (۱۲) اشاره کرد. با تکیه بر این موارد می‌توان گفت که نعناع در میان داروهای گیاهی از لحاظ پزشکی اهمیت ویژه‌ای دارد و باید مطالعات بیشتری بر روی این گیاه و خواص ناشناخته آن صورت بگیرد.

در باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* یک اپرونی بنام pel وجود دارد که از هفت ژن (*pelA, pelB, pelC, pelD, pelE, pelF*, and *pelG*) تشکیل شده که در شکل‌گیری پوسته (pellicle formation) نقش ایفا می‌کند. نقش پروتئین‌هایی که توسط ژن‌های اپرون pel کدگذاری می‌شوند فقط برای ژن *pelC* و ژن *pelD* مشخص شده است (۱۳, ۱۴). آنالیزهای بیو انفورماتیک نشان می‌دهد که ژن *pelF* یک گلیکوزیل ترانسفراز است (۱۴). *pelF* در مطالعات مختلف نشان داده شده است که در تشکیل بیوفیلم می‌تواند نقش داشته باشد (۱۵, ۱۶).

سودوموناس آئروژینوزا یک باکتری گرم منفی است که بیشتر در پیرامون ما یافت می‌شود. این میکروارگانیسم در خاک، آب و دیگر محیط‌های نمناک یافت می‌شود. *سودوموناس آئروژینوزا* یک بیماری‌زای فرصت طلب است (۱۷). *سودوموناس آئروژینوزا* سبب عفونت‌های مجاری ادراری، سیستم تنفسی، التهاب و آماس پوست، عفونت‌های بافت‌های نرم، باکتریمی (وجود باکتری در خون) عفونت‌های استخوان و مفاصل، عفونت‌های معده و روده‌ای و عفونت‌های سیستمیک گوناگون به ویژه در بیماران با سوختگی‌های شدید، بیماران دچار به سرطان و ایدز که سیستم ایمنی آنها سرکوب شده‌است، می‌نماید (۱۷).

با مصرف گسترده آنتی‌بیوتیک‌ها سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* مقاوم به چند دارو در سراسر جهان به طور فزاینده‌ای افزایش یافته است(۱۸). میزان مرگ‌ومیر در بیماران دچار نقص ایمنی توسط پنومونی های ناشی از *سودوموناس آئروژینوزا* ی بیمارستانی در حدود ۷۹ درصد می‌باشد (۱۹). افزایش روزافزون مقاومت‌های آنتی بیوتیکی مشکلات زیادی در بیماران ایجاد نموده است که سبب مشکلات زیادی در درمان و افزایش مرگ‌ومیر شده است (۲۰). هدف از این مطالعه تعیین اثر عصاره نعناع بر روی باکتری و بیوفیلم *سودوموناس آئروژنوزا* و تعیین کمترین

[۱] Lamiaceae
[۲] *Staphylococcus aureus*
[۳] *Salmonella Typhimurium*
[۴] *E. coli*
[۵] *Listeria monocytogenes*

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 11:31 IRDT on Saturday July 13th 2019

غلظت مهاری[1]، کمترین غلظت باکتری کشی[2] و غلظت مهاری بیوفیلم[3] عصاره نعناع بر روی *سودوموناس آئروژنوزا* جدا شده از بیماران بستری می باشد. از طرفی تعیین فراوانی ژن *pelF* و ارزیابی ارتباط حضور این ژن با تشکیل بیوفیلم می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تعداد نمونه و نحوه جداسازی باکتری *سودوموناس آئروژینوزا*

۲۰۸ سویه سودوموناس آئروژینوزا از نمونه‌های زخم، ادرار، خون، دستگاه تنفسی، سپتوم و مایع مغزی نخاعی بیماران مختلف از بیمارستان‌های امام رضا (ع)، سینا و شهید مدنی شهرستان شهرستان تبریز از اردیبهشت ۱۳۹۶ تا تیر ۱۳۹۶ جمع‌آوری شد. از بیماران رضایت کامل گرفته شد و در فرمی که به آنها داده شد اطلاعات دموگرافیک ثبت گردید و اطلاعات بیماران بصورت محرمانه نگهداری شد. لازم به توضیح است که بیمارانی که از آنتی بیوتیک تا دو هفته قبل از نمونه‌گیری مصرف کرده بودند از مطالعه خارج شدند. برای تشخیص و تایید باکتری از رنگ‌آمیزی گرم، تست اکسیداز، تست کاتالاز، محیط SIM[4]، متیل رد[5]، وگس پروسکائر[6]، محیط سه قند- آهن[7]، سیمون سیترات آگار، اورنیتین دکربوکسیلاز، لیزین دکربوکسیلاز، آرژینین دهیدروژناز، رشد بر روی محیط گلوکز (مرک، آلمان) استفاده شد (۲۱, ۲۲).

تهیه عصاره نعناع به روش ماسراسیون (خیساندن)

نعناع مورد استفاده در دانشکده کشاورزی دانشگاه مراغه شناسایی شد که متعلق به رده دولپه‌ای‌های پیوسته گلبرگ، راسته نعناسانان، تیره نعناعیان، تبار Mentheae، سرده Mentha، گونه spicata می‌باشد. عصاره‌گیری مطابق مقاله Demetrio L. Valle Jr با کمی تغییر انجام شد (۲۳) که ۱۰۰ گرم از برگ‌های خشک شده نعناع در سایه را برداشته و به کمک آسیاب آن را پودر کرده سپس پودر را با ۵۰۰ میلی لیتر اتانول ۸۰ درصد مخلوط و به مدت ۲۴- ۴۸ ساعت در دمای آزمایشگاه در داخل یک ارلن استریل در بسته روی شیکر قرار داده شد تا خوب پودر و الکل با هم مخلوط شوند. بعد از گذشت ۴۸ ساعت محلول در ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس مایع رویی از کاغذ واتمن عبور داده شد و دوباره باقی مانده سانتریفوژ را با ۳۰۰ میلی لیتر اتانول مخلوط و مراحل تکرار شد. در نهایت دو مایع بدست آمده را با هم مخلوط و در داخل پلیت‌های شیشه‌ای ریخته و داخل آون ۴۰-۵۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد تا کاملاً تغلیظ شود و الکل آن خارج شود. سپس عصاره خشک شده از آون خارج شد و داخل فالکون استریل فویل شده در یخچال نگهداری شد.

تهیه محلول عصاره نعناع در حلال DMSO

از ۲۰۰ گرم پودر گیاه نعناع ۲۰ گرم عصاره خشک شده بدست آمد که برای تهیه محلول عصاره نعناع ، ۰/۸ گرم از پودر عصاره نعناع در یک میلی لیتر حلال DMSO (Sigma-Aldrich,St. Louis,Mo, USA) حل شد و در فالکون استریل در یخچال نگهداری شد.

روش بررسی اثرگذاری عصاره نعناع بر باکتری *سودوموناس آئروژینوزا*

برای تعیین اثر عصاره نعناع بر روی باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* از سوش استاندارد *سودوموناس آئروژینوزا* با شماره استاندارد ATCC27853 و همچنین از ۱۵ سویه بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* به صورت تصادفی (برای اطمینان از

[1] Minimum Inhibitory Concentration: MIC
[2] Minimum Bactericidal Concentration: MBC
[3] Biofilm Inhibitory Concentration:BIC
[4] Sulfur Indole Motility Media
[5] Methyl Red: MR
[6] Voges-Proskauer: VP
[7] Triple Sugar Iron:TSI

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 11:31 IRDT on Saturday July 13th 2019

اثر عصاره نعناع و ادامه کار بر روی نمونه های بالینی) به روش دیفیوژن بر روی محیط مولر هینتون آگار استفاده شد. در ۱۶ پلیت استریل، محیط کشت مولر هینتون آگار تهیه و با استفاده از سواب استریل از کلنی باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* برداشته و بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار به طور چمنی کشت داده شد. سپس دو چاهک با قطر ۷ میلی لیتر در پلیت‌ها ایجاد گردید. در یک چاهک ۱۵۰ میکرولیتر حلال DMSO و در دیگری ۱۵۰ میکرو لیتر محلول عصاره نعناع ریخته شد. نهایتا محیط‌های کشت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از طی ۲۴ ساعت قطر هاله عدم رشد در اطراف چاهک‌ها در تمامی محیط‌های کشت بررسی شد.

رقت‌سازی عصاره نعناع در محیط کشت مولر هینتون

برای تعیین غلظت MICعصاره نعناع، در ابتدا رقت‌های مختلفی از عصاره نعناع تهیه شد. بدین منظور ۹ لوله آزمایش استریل آماده شد و توسط محیط کشت مولر هینتون و محلول ۰/۸ گرم بر میلی لیتر عصاره نعناع رقت‌های مختلف تهیه شد. بدین ترتیب در لوله اول رقت $\frac{۱}{۲}$ ، در لوله دوم رقت $\frac{۱}{۴}$ ، در لوله سوم رقت $\frac{۱}{۸}$ ، در لوله چهارم رقت $\frac{۱}{۱۶}$ ، در لوله پنجم رقت $\frac{۱}{۳۲}$ ، در لوله ششم رقت $\frac{۱}{۶۴}$ ، در لوله هفتم رقت $\frac{۱}{۱۲۸}$ ، در لوله هشتم رقت $\frac{۱}{۲۵۶}$ و در لوله نهم رقت $\frac{۱}{۵۱۲}$ از محلول عصاره نعناع بدست آمد.

تعیین MIC به روش آگار دایلوشن

به علت تیره بودن رنگ عصاره، خواندن OD یا رویت کدورت رشد در روش‌های میکروبراث دایلوشن و براث دایلوشن از دقت کمی برخوردار خواهد بود از روش آگاردایلوشن مطابق با پروتکل CLSI منتشر شده در سال ۲۰۱۷ برای تعیین MIC عصاره نعناع استفاده شد. برای این منظور ۹ پلیت استریل آماده شد و هر پلیت به ۱۶ قسمت تقسیم (برای ۱۶ نمونه بخاطر تکرار پذیری) و هر قسمت با توجه به شماره نمونه‌ها شماره‌گذاری گردید. سپس لوله‌های حاوی رقت‌های مختلف عصاره نعناع در محیط کشت مولر هینتون آگار (۹ لوله)، قبل از سفت شدن محیط بلافاصله به داخل پلیت‌ها منتقل شد. در مرحله بعد $۱۰^۴$ باکتری به مقدار ۱ میکرولیتر بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار تلقیح گردید. نهایتا تمامی ۹ پلیت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. بعد از طی ۲۴ ساعت پلیت‌ها از انکوباتور خارج شد و غلظتی از عصاره نعناع که در پلیت مربوط به آن که کلنی مشاهده نشد (پلیت قبلی پلیت حاوی کلنی‌های رشد کرده)، به عنوان غلظت MIC در نظر گرفته شد.

تعیین میزان MBC عصاره نعناع

برای تعیین میزان MBC مطابق با پروتکل CLSI، ۱۰ میکرولیتر از هریک از لوله‌های حاوی رقت‌های مختلف عصاره نعناع تهیه شده در مراحل تعیین MIC (۹ لوله) برداشته و با استفاده از سواپ استریل بر روی محیط مولر هینتون آگار به طور چمنی کشت داده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد.

تعیین زمان موثر تشکیل بیوفیلم قوی

برای این منظور یک پلیت ۹۶ خانه‌ای استریل آماده شد و به تمامی چاهک‌های آن به مقدار ۱۵۰ میکرولیتر محیط مولر هینتون براث ریخته شد. سپس داخل تمامی چاهک‌ها به غیر از ستون ۱۲ (به عنوان کنترل) ، به مقدار ۸۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سوش استاندارد به مقدار $۱۰^۸$ × ۱/۵ باکتری ریخته شد. نهایتا پلیت ۹۶ خانه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۲، ۲۴، ۳۶، ۴۸ ،۶۰ و۷۲ ساعت انکوبه شد. در مرحله بعد پلیت از انکوباتور خارج و ردیف اول آن با PBS

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 11:31 IRDT on Saturday July 13th 2019

شستشو داده شد و بعد از خشک شدن، به درون چاهک‌های ردیف اول به مقدار ۲۰۰ میکرولیتر متانول مطلق (مرک، آلمان) ریخته شد و بعد از گذشت زمان ۱۵ دقیقه، متانول خارج گردید و ۳ بار با بافر PBS شستشو داده شد. بعد از خشک شدن، به مقدار ۲۰۰ میکرولیتر کریستال ویوله (مرک، آلمان) ۰/۱ درصد اضافه گردید و پس از انتظار ۵ دقیقه در دمای اتاق، ۳ بار با بافر PBS شستشو داده شد. نهایتا به میزان ۲۰۰ میکرولیتر اتانول به هر چاهک اضافه گردید و جذب نوری تمامی چاهک‌ها با دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۵۳۰ اندازه‌گیری شد (۲۴).

تعیین کمترین غلظت مهار بیوفیلم توسط عصاره نعناع(BIC)

برای این منظور یک میکروپلیت استریل ۹۶ خانه آماده شد و به مقدار ۱۵۰ میکرولیتر از محیط کشت مولر هینتون براث به همراه یک درصد گلوکز و آرژنین به تمامی چاهک‌های آن اضافه شد. سپس به تمامی چاهک‌ها بجز ستون کنترل، مقدار ۸۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سوش استاندارد *سودوموناس آئروژینوزا* اضافه گردید و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت (زمان لازم برای تشکیل بیوفیلم قوی) انکوبه شد. بعد از ۴۸ ساعت، پلیت از انکوباتور خارج و با PBS سه بار شستشو داده شد و بعد از خشک شدن، عصاره نعناع با رقت‌های مورد نظر تا ستون نهم ریخته شد و در زمان های ۱۲، ۲۴، ۳۶، ۴۸، ۶۰ و ۷۲ ساعت انکوبه شده و بعد از انکوبه سه بار شستشو داده و بعد از اضافه کردن محیط کشت تازه، OD1 با دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۶۳۰ اندازه‌گیری شد. سپس پلیت به مدت ۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد و بعد از آن جذب نوری دوم (OD2) برای تمامی خانه‌ها اندازه‌گیری شد (۲۵).

واکنش زنجیری پلی‌مراز (PCR)

استخراج DNA توسط کیت شرکت سیناژن و طبق پرتکل شرکت انجام گرفت و بعد از تعیین خلوص و غلظت DNA آزمایش PCR انجام گرفت. برای انجام PCR ۱ میکرولیتر از پرایمر F و ۱ میکرولیتر از پرایمر R رقیق شده، ۱۲/۵ میکرولیتر Master Mix، ۹/۵ میکرولیتر آب دیونیزه و ۳ میکرولیتر DNA الگو اضافه گردید. نهایتا میکروتیوپ در دستگاه PCR قرار داده شد و برای ۳۴ سیکل انجام شد که واسرشت[۱] اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه دقیقه و واسرشت ثانویه ۹۴ درجه سانتیگراد در ۳۰ ثانیه، چسبیدن پرایمر[۲] در ۵۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه و طویل سازی DNA[۳] در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه انجام شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده برای ژن *PelF* به صورت ذیل بود(۲۶).

Forward primer: 5′-GAG GTC AGC TAC ATC CGT CG-3′

Revers primer: 5′-TCA TGC AAT CTC CGT GGC TT-3′

روش تجزیه و تحلیل آماری

نتایج توسط نرم افزار SPSS v.24 توسط آزمون توصیفی و کای اسکور مورد بررسی قرار گرفت و سطح معنی‌داری $P<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در این مطالعه ۲۰۸ سویه بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* از بیماران بستری بیمارستان های امام رضا (ع)، سینا و شهید مدنی شهرستان تبریز از نمونه‌های بالینی مختلفی از جمله زخم، خون، ادرار، دستگاه تنفسی، مایع مغزی-نخاعی و سپتوم جداسازی شد.

[۱] Denaturation

[۲] Annealing

[۳] Extension

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 11:31 IRDT on Saturday July 13th 2019

فراوانی افراد نمونه‌گیری شده بر حسب جنسیت و گروه سنی

از ۲۰۸ سویه بالینی جمع‌آوری شده، ۱۴۰ مورد (۶۷/۳) مرد و ۶۸ مورد (۳۲/۷ درصد) زن بودند. میانگین سنی ۳۲ سال بود و ۶۴ نفر (۳۰ درصد) در گروه سنی ۱۵-۲۵، ۸۴ نفر (۴۰ درصد) در گروه سنی ۲۶-۳۵ و ۶۰ نفر (۳۰ درصد) در گروه سنی ۳۶-۴۵ قرار داشتند. در گروه سنی ۱۵-۲۵ سال ۵۲ مورد (۸۱/۳ درصد) مرد و ۱۲ مورد (۱۸/۸ درصد) زن، در گروه سنی ۲۶-۳۵ سال ۶۴ مورد (۷۶/۲ درصد) مرد و ۲۰ مورد (۲۳/۸ درصد) زن، در گروه سنی ۳۶-۴۵ سال ۲۴ مورد (۴۰ درصد) مرد و ۳۶ مورد (۶۰ درصد) زن بودند. بیشتر مردان در گروه سنی ۲۶-۳۵ و بیشتر زنان در گروه سنی ۳۶-۴۵ بودند.

فراوانی افراد نمونه‌گیری شده برحسب نوع نمونه گرفته شده

از ۲۰۸ سویه بالینی مورد مطالعه، از ۸۴ نفر (۴۰/۴ درصد) نمونه زخم، از ۶۴ نفر (۳۰/۸ درصد) نمونه ادرار، از ۲۰ نفر (۹/۶ درصد) نمونه دستگاه تنفسی، از ۲۴ نفر (۱۱/۵ درصد) نمونه خونی، از ۱۲ نفر (۵/۸ درصد) نمونه مایع مغزی- نخاعی و از ۴ نفر (۱/۹ درصد) نمونه سپتوم گرفته شد (جدول ۲). در رده سنی ۱۵-۲۵ تعداد ۲۸ نفر (۴۳/۸ درصد) از زخم، ۲۰ نفر (۳۱/۳ درصد) از ادرار، ۴ نفر (۶/۳ درصد) از دستگاه تنفسی، ۴ نفر (۶/۳ درصد) از خون، ۸ نفر از مایع مغزی – نخاعی (۱۲/۵ درصد) نمونه‌برداری صورت گرفت. در رده سنی ۲۵-۲۶ ، تعداد ۳۲ نفر (۳۸/۱ درصد) از زخم، ۲۰ نفر (۲۳/۸ درصد) از ادرار، ۱۶ نفر (۱۹ درصد) از دستگاه تنفسی، ۸ نفر (۹/۵ درصد) از خون، ۴ نفر (۴/۸ درصد) از مایع مغزی-نخاعی و ۴ نفر (۴/۸ درصد) از سپتوم نمونه‌برداری انجام گرفت. در رده سنی ۳۶-۴۵، تعداد ۲۴ نفر (۴۰ درصد) از زخم، ۲۴ نفر (۴۰ درصد) از ادرار و ۱۲ نفر (۲۰ درصد) از خون نمونه‌برداری صورت گرفت (جدول ۱).

فراوانی افراد نمونه‌گیری شده بر حسب قدرت تشکیل بیوفیلم

بررسی داده‌ها نشان داد که از ۲۰۸ نفر مورد بررسی، در ۲۴ نفر (۱۱/۵۳) بیوفیلم متوسط و در ۱۸۴ نفر (۸۸/۴۶) بیوفیلم قوی از باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* مشاهده گردید (جدول ۱).

فراوانی افراد نمونه‌گیری شده بر حسب قدرت تشکیل بیوفیلم در ارتباط با نوع نمونه گرفته شده

از جامعه هدف مورد بررسی، از نمونه‌های گرفته شده از زخم به تعداد ۶۴ نفر (۷۶/۲ درصد) بیوفیلم قوی و۲۰ نفر (۲۳/۸ درصد) بیوفیلم متوسط، از نمونه‌های گرفته شده از ادرار ۶۴ نفر بیوفیلم قوی (۱۰۰ درصد) و بدون تشکیل بیوفیلم ضعیف، از نمونه‌های گرفته شده از دستگاه تنفسی ۲۰ نفر بیوفیلم قوی (۱۰۰ درصد) و بدون بیوفیلم متوسط، از نمونه‌های گرفته شده از خون ۲۰ نفر (۸۳/۳ درصد) بیوفیلم قوی و ۴ نفر (۱۶/۷ درصد) بیوفیلم متوسط، از نمونه‌های گرفته شده از مایع مغزی- نخاعی ۱۲ نفر بیوفیلم قوی (۱۰۰ درصد) و بدون بیوفیلم متوسط، از نمونه‌های گرفته شده از سپتوم ۴ نفر بیوفیلم قوی (۱۰۰ درصد) تشکیل دادند (جدول ۱). با آنالیز آماری بر روی داده‌ها نشان می‌دهد که اختلاف معنی-داری بین قدرت تشکیل بیوفیلم و نوع نمونه گرفته شده وجود دارد (P=۰/۰۰۰۱).

تعیین اثر عصاره نعناع بر سوش استاندارد *سودوموناس آئروژینوزا*

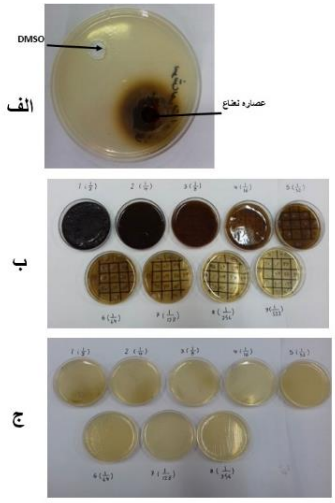
بررسی داده‌های بدست آمده از تاثیر عصاره نعناع بر سوش استاندارد *سودوموناس آئروژینوزا* نشان داد که عصاره نعناع باعث تشکیل هاله عدم رشد بر روی باکتری *سودوموناس*

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 11:31 IRDT on Saturday July 13th 2019

آئروژینوزا می‌گردد (غلظت ۸۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر از عصاره نعناع) در حالیکه DMSO که به عنوان حلال عصاره نعناع استفاده شد هیچ گونه هاله عدم رشدی را نشان نداد (شکل ۱-الف).



شکل ۱- تعیین اثر مهارکنندگی، MIC و MBC عصاره نعناع بر روی باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* جدا شده از بیماران بستری. الف) تاثیر عصاره نعناع بر روی سوش استاندارد *سودوموناس آئروژینوزا* که در غلظت ۸۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر اثر مهاری داشت. ب) تعیین MIC عصاره نعناع نشان داد که پلیت چهارم با رقت $\frac{۱}{۱۶}$ عصاره نعناع یعنی غلظت ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر اثر مهاری روی سوش استاندارد *سودوموناس آئروژینوزا* داشت. ج) تعیین غلظت باکتری‌کشی عصاره نعناع بر روی سوش استاندارد *سودوموناس آئروژینوزا* که در رقت $\frac{1}{8}$ در پلیت سوم یعنی غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اثر باکتری‌کشی داشت.

تعیین MICعصاره نعناع به روش آگاردایلوشن

بررسی داده‌های حاصل از تعیین MIC عصاره نعناع نشان داد که پلیت چهارم با رقت$\frac{۱}{۱۶}$ عصاره نعناع یعنی غلظت ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر، حداقل رقتی است که از رشد *سودوموناس آئروژینوزا* ممانعت می‌کند (شکل ۱- ب)

تعیین MBC عصاره نعناع

بررسی داده‌های بدست آمده نشان داد که عصاره نعناع با رقت $\frac{۱}{۸}$ در پلیت سوم یعنی غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر، باعث کشتن تمامی کلنی‌های باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* می‌شود (شکل ۱- ج).

تعیین زمان مناسب و شدت تشکیل بیوفیلم به صورت ضعیف، متوسط و قوی

برای تعیین زمان مناسب تشکیل بیوفیلم قوی، در میکروپلیت ۹۶ خانه محیط کشت مولرهینتون حاوی یک درصد گلوکز و آرژنین را با باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* کشت داده و در زمان های ۲۴،۱۲، ۳۶، ۴۸، ۶۰ و ۷۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه کرده و نتایج را بعد از شستشو و فیکس و رنگ آمیزی با کریستال ویوله ۰/۱ درصد در طول موج ۵۳۰ نسبت به کنترل که محیط کشت فاقد باکتری بود خوانش شد.

- اگر OD نمونه تست برابر یا کمتر از OD کنترل باشد یعنی بیوفیلم تشکیل نشده است.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 11:31 IRDT on Saturday July 13th 2019

- اگر OD نمونه تست بیشتر از OD کنترل و کمتر از دو برابر OD کنترل باشد یعنی بیوفیلم ضعف تشکیل شده است.
- اگر OD نمونه تست بیشتر دو برابر OD کنترل و کمتر از چهار برابر OD کنترل باشد یعنی بیوفیلم متوسط تشکیل شده است.
- اگر OD نمونه بیشتر از چهار برابر OD کنترل باشد یعنی بیوفیلم قوی تشکیل شده است (۱۹).

در نتیجه در زمان ۴۸ ساعت بیوفیلم قوی تشکیل شد. لازم به ذکر است که برای ۲۰۸ جدایه، نوع شدت بیوفیلم مورد بررسی قرار گرفت.

تعیین کمترین غلظت مهار بیوفیلم (BIC) توسط عصاره نعناع

در این مطالعه بر خلاف بیشتر مطالعات انجام شده در کشور، تصمیم گرفته شد که تاثیر عصاره نعناع بعد از تشکیل بیوفیلم مورد بررسی قرار داده شود. در یک میکروپلیت ۹۶ خانه محیط کشت مولر هینتون براث و باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* کشت داده و به مدت ۴۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد تا بیوفیلم قوی تشکیل شود.

بعد از تشکیل بیوفیلم چاهک‌ها خالی شده و بعد از شستشو به آنها رقت‌های مختلف عصاره نعناع اضافه گردید و به مدت ۱۲، ۲۴، ۳۶، ۴۸، ۶۰ و ۷۲ ساعت انکوبه گردید در زمان مربوطه چاهک‌ها خالی شده و شستشو داده می‌شود و بعد از اضافه کردن محیط کشت OD_1 و ۷ ساعت بعد هم OD_2 خوانده شده و بر حسب فرمول زیر BIC عصاره نعناع محاسبه گردید (۲۰).

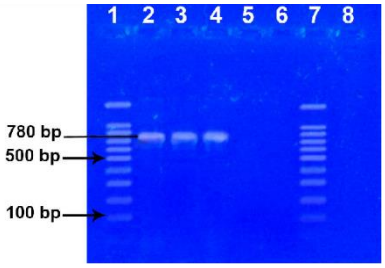
$OD_C= OD_1-OD_2$ و $OD_T= OD_1-OD_2$

$BIC= OD_T-OD_C\geq 0.1$

در نتیجه BIC عصاره نعناع در رقت $\frac{۱}{۱۶}$ یعنی ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر به دست آمد.

تعیین حضور ژن *PelF* در تشکیل بیوفیلم

تمام نمونه‌های گرفته شده یعنی ۲۰۸ (۱۰۰ درصد) دارای ژن *PelF* بودند. رابطه معنی‌داری بین تشکیل بیوفیلم و حضور ژن *pelF* وجود داشت (*P*=۰/۰۰۰۱).



شکل ۲- الکتروفورز محصول PCR برای ژن *PelF*. ردیف ۱: مارکر (100bp DNA ladder,). ردیف ۲: نمونه بالینی PCR مثبت ژن*PelF* . ردیف ۳: نمونه بالینی PCR مثبت ژن*PelF* . ردیف ۴:کنترل مثبت ژن *PelF* ، ردیف ۵: نمونه بالینی منفی. ردیف ۶: نمونه بالینی منفی، ردیف ۷: مارکر (100bp DNA ladder,)، ردیف ۸: کنترل منفی

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 11:31 IRDT on Saturday July 13th 2019

جدول ۱- فراوانی و درصد انواع نمونه‌های بالینی جمع‌آوری شده بر حسب گروه‌های سنی و شدت تشکیل بیوفیلم

نوع نمونه جمع‌آوری شده	زخم	ادرار	دستگاه تنفسی	خون	مایع مغزی-نخاعی	سپتوم	مجموع
فراوانی نمونه‌های جمع‌آوری شده	۸۴ (۴۰/۴ ٪)	۶۴ (۳۰/۸ ٪)	۲۰ (۹/۶ ٪)	۲۴ (۱۱/۵ ٪)	۱۲ (۵/۸ ٪)	۴ (۱/۹ ٪)	۲۰۸ (۱۰۰ ٪)
رده سنی ۲۵-۱۵	۲۸ (۴۳/۸ ٪)	۲۰ (۳۱/۳ ٪)	۴ (۶/۳ ٪)	۴ (۶/۳ ٪)	۸ (۱۲/۵ ٪)	۰ (۰٪)	۶۴ (۳۰ ٪)
رده سنی ۳۵-۲۶	۳۲ (۳۸/۱ ٪)	۲۰ (۲۳/۸ ٪)	۱۶ (۱۹ ٪)	۸ (۹/۵ ٪)	۴ (۴/۸ ٪)	۴ (۴/۸ ٪)	۸۴ (۴۰ ٪)
رده سنی ۴۵-۳۶	۲۴ (۴۰ ٪)	۲۴ (۴۰ ٪)	۰ (۰ ٪)	۱۲ (۲۰ ٪)	۰ (۰ ٪)	۰ (۰ ٪)	۶۰ (۳۰ ٪)
تشکیل بیوفیلم قوی	۶۴ (۷۶/۲ ٪)	۶۴ (۱۰۰ ٪)	۲۰ (۱۰۰ ٪)	۲۰ (۸۳/۳ ٪)	۱۲ (۱۰۰ ٪)	۴ (۱۰۰ ٪)	۱۸۴ (۸۸/۴۶ ٪)
تشکیل بیوفیلم متوسط	۲۰ (۲۳/۸ ٪)	۰ (۰ ٪)	۰ (۰ ٪)	۴ (۱۶/۷ ٪)	۰ (۰ ٪)	۰ (۰ ٪)	۲۴ (۱۱/۵۳ ٪)
تشکیل بیوفیلم ضعیف	۰ (۰ ٪)	۰ (۰ ٪)	۰ (۰ ٪)	۰ (۰ ٪)	۰ (۰ ٪)	۰ (۰ ٪)	۰ (۰ ٪)

بحث

نتایج نشان داد که عصاره نعناع باعث تشکیل هاله عدم رشد گردید. در مرحله بعد با روش آگار دایلوشن، رقت $\frac{۱}{۱۶}$ (غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) بعنوان رقت MIC عصاره نعناع تعیین شد. رقت $\frac{۱}{۸}$ (غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) نیز بعنوان رقت MBC عصاره نعناع تعیین گردید. در این تحقیق بررسی داده‌های حاصل از اندازه‌گیری جذب نوری نشان داد که مدت ۴۸ ساعت بهترین و موثرترین زمان تشکیل بیوفیلم قوی برای سوش استاندارد *سودوموناس آئروژینوزا* می‌باشد. رقت $\frac{۱}{۱۶}$ (غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) عصاره نعناع کمترین رقت مهار بیوفیلم (BIC) سوش استاندارد *سودوموناس آئروژینوزا* تعیین شد. در این مطالعه نقش ژن *PelF* در تشکیل بیوفیلم *سودوموناس آئروژینوزا* بررسی گردید و نتایج نشان داد که ژن *pelF* در تشکیل بیوفیلم تمامی نمونه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* حضور دارد.

سودوموناس آئروژینوزا قادر به رشد در اغلب محیط‌های زنده عمدتا آب و خاک است. این باکتری یکی از مهمترین عوامل بیماری‌زای فرصت طلب است و اغلب در عفونت‌های بیمارستانی یافت می‌شود و مسئول ۱۶ درصد موارد پنومونیه بیمارستانی ، ۱۲ درصد عفونت‌های دستگاه ادراری اکتسابی بیمارستان ، ۸ درصد عفونت‌های زخم‌های جراحی و ۱۰ درصد عفونت‌های خونی است. بیماران با نقص سیستم ایمنی و سرطان و بیماران سیستیک فیبروزیس[۱] به طور ویژه‌ای به عفونت‌های ایجاد شده توسط این باکتری حساس هستند و در بیماران سیستیک فیروزیس تهدید کننده زندگی است (۲۷).

نتایج بدست آمده در این مطالعه نشان می‌دهد که عصاره نعناع هم بر روی باکتری سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از بیماران و هم بر روی بیوفیلم این باکتری اثر مهاری و کشندگی دارد و از طرفی رابطه معنی‌داری چشمگیری بین تشکیل بیوفیلم قوی این باکتری با حضور ژن *pelF* وجود دارد.

فرزایی و همکاران در سال ۲۰۱۵ مطالعه‌ای در ایران بر روی اثر عصاره نعناع بر روی باکتری‌ها و قارچ‌های پاتوژن مورد مطالعه قرار دادند. بر اساس این تحقیق محتوای فنولی عصاره نعناع خواص ضدمیکروبی و ضد قارچی متوسطی بر علیه

[۱] Cystic fibrosis

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 11:31 IRDT on Saturday July 13th 2019

باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت مثل *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیاکلی* و *سودوموناس آئروژینوزا* دارد (۲۸).

پولیپاتی[۱] و همکاران در سال ۲۰۱۶ اثر بازدارنگی عصاره نعناع بر روی پیشرفت بیوفیلم *سودوموناس آئروژینوزا* و *کاندیدا آلبیکانس* بصورت درون‌تنی بررسی کردند. روغن نعناع در غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم فعالیت ضدباکتریایی را در مقابل *استافیلوس اورئوس*، *اشریشیاکلی*، *سودوموناس آئروژینوزا* نشان داد (۲۹).

نیکلای[۲] و همکاران پتانسیل ضدمیکروبی عصاره اتانولی و روغن ضروری چندین گیاه از تیره لامیاسه شامل نعناع، آویشن باغی[۳]، مریم‌گلی[۴]، اسطخودوس[۵]، ریحان[۶]، بادرنجبویه[۷]، مرزنجوش[۸] را در مقابل باکتری‌های جانوری مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها شامل *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سالمونلا انتریتیدیس*[۹]، *اشریشیاکلی* و *سودوموناس آئروژینوزا* مورد مطالعه قرار دادند و نتیجه تحقیق، مهار و کشندگی باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* را با بیشترین میزان MIC و MBC[۱۰] یعنی بین ۲-۴ درصد، در مقابل تمامی عصاره‌ها نشان داد (۳۰).

سیلان[۱۱] و همکاران در سال ۲۰۱۴، فعالیت‌های ضدبیوفیلمی و ضدمیکربی روغن نعناع (*Mentha x piperita*) بر روی باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *استافیلوکوکوس اپیدرمیس*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *سودوموناس فلوئورسنس*[۱۲] و مخمر *کاندیدا آلبیکانس* مطالعه کردند. روغن نعناع (*M. x piperita*) بر روی تمای باکتری‌های مورد آزمایش بجز *سودوموناس آئروژینوزا* ، فعالیت ضدمیکروبی ظاهر کرد (۳۱). نتایج این تحقیق از لحاظ فعالیت ضدمیکروبی نعناع بر روی *سودوموناس آئروژینوزا* با نتایج مطالعه حاضر مغایرت دارد. علت تفاوت می‌تواند به نوع نمونه گرفته شده و همچنین نوع عصاره که در مطالعه سیلان از روغن نعناع استفاده شده، باشد.

لانگ[۱۳] و همکاران در سال ۲۰۱۶ اثرات ترکیبی روغن‌های ضروری گیاهان نعناع، دارچین[۱۴] و سیر[۱۵] را بر روی تشکیل بیوفیلم *سودوموناس آئروژینوزا* (PA01) مطالعه کردند و نتایج نشان داد که چسبندگی و شروع تشکیل بیوفیلم *سودوموناس آئروژینوزا* (PA01) شدیدا" توسط ترکیبات روغنی مهار شد و در غلظت‌های بالاتر این ترکیبات بطور کامل باعث برداشته شدن بیوفیلم گردید (۳۲). نتایج این مطالعات به جهت تاثیر عصاره نعناع بر روی مهار باکتری بیوفیلم *سودوموناس آئروژینوزا* و مهار تشکیل بیوفیلم با نتایج مطالعه حاضر در این تحقیق همخوانی دارد.

سنداسی[۱۶] و همکارن در سال ۲۰۱۱، پتانسیل مهار رشد بیوفیلم میکروب‌های *سودوموناس آئروژینوزا* و *کاندیدا آلبیکانس* را با تیمار هشت عصاره گیاهی بصورت درون‌تنی بررسی کردند. نتایج نشان داد که از بین این گیاهان عصاره گیاهان نعناع، سرخارگل و رزماری بیشترین فعالیت ضدمیکروبی را با میزان MIC بین ۰/۳۸-۲/۵ میلی‌گرم در هر

[۱] Pulipati
[۲] Niculae
[۳] *Thymus vulgaris*
[۴] *Salvia officinalis*
[۵] *Lavandula officinalis*
[۶] *Ocimum basilicum*
[۷] *Mellisa officinalis*
[۸] *Origanum vulgare*
[۹] Salmonella Enteritidis
[۱۰] Minimum bactericidal concentration
[۱۱] Ceylan
[۱۲] Pseudomonas fluorescence
[۱۳] Lang
[۱۴] *Cinnamomum verum*
[۱۵] *Allium sativum*
[۱۶] Sandasi

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 11:31 IRDT on Saturday July 13th 2019

میلی‌لیتر، از خود نشان دادند. همچنین بیشتر عصاره‌ها کلونیزاسون میکروبی را تا حد ۵۰ درصد کاهش دادند (۳). نتایج این تحقیق بدلیل وجود فعالیت ضد میکروبی عصاره نعناع و مهار باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* توسط آن با نتایج ما مشابهت دارد.

کلوین[۱] و همکاران وابستگی ایزوله‌های آزمایشگاهی و محیطی *سودوموناس آئروژینوزا* را به ژن‌های *Pel* و *Psl* برای تشکیل و پیشرفت بیوفیلم ارزیابی نمودند و به این نتیجه رسیدند که ژن‌های ژن‌های *Pel* و *Psl* عملکرد مهمی در شکل‌گیری ساختار بیوفیلم بالغ ایجاد می‌کنند بطوریکه جهش در این ژن‌ها منجر به کاهش تشکیل بیوفیلم می‌گردد. همچنین در مورد نقش محافظتی و ساختاری پلی ساکارید *Pel* در ماتریکس بیوفیلم *سودوموناس آئروژینوزا* مطالعه نمودند و اثبات کردند که پلی‌ساکارید *Pel* در بیوفیلم‌ها نقش عملکردی دارد و برای حفظ برهمکنش‌های سلول به سلول در بیوفیلم PA14 حیاتی است. نتایج این مطالعات با یافته‌های ما مبنی بر حضور ژن *Pel* در تشکیل بیوفیلم مطابقت دارد (۱۵). در مطالعه‌ای دیگر سکوراگی[۲] و همکاران نشان دادند که موتانت-های *lasI* و *rhlI*، تولید اگزوپلی‌ساکاریدهای ماتریکسی غنی از گلوکز حاصل از رونویسی اپرون *PeFl* را به شدت کاهش می‌دهند که این امر اهمیت بیان ژن *Pel* را در تشکیل بیوفیلم به اثبات می‌رساند (۱۶).

نتیجه‌گیری

با توجه پتانسیل بالای *سودوموناس آئروژینوزا* در تشکیل بیوفیلم و خاصیت مهار کنندگی رشد میکروبی و بیوفیلمی عصاره نعناع که در این مطالعه اثبات شد و همچنین با توجه به نتایج سایر مطالعات ذکر شده در فوق می‌تواند نتیجه گرفت که از عصاره نعناع می‌توان در ترکیبات مختلف برای رفع عفونت‌های باکتری‌های پاتوژن مثل *سودوموناس آئروژینوزا* استفاده گردد و از طرفی می‌توان گفت که ژن *pelF* در تشکیل بیوفیلم *سودوموناس آئروژینوزا* می تواند نقش داشته باشد.

تعارض منافع

بین تمامی نویسندگان هیچ گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

References

1. Hamilton AC. Medicinal plants, conservation and livelihoods. Biodiversity & Conservation 2004;13(8):1477-517.
2. Giaouris E, Heir E, Hébraud M, Chorianopoulos N, Langsrud S, Møretrø T, *et al*. Attachment and biofilm formation by foodborne bacteria in meat processing environments: causes, implications, role of bacterial interactions and control by alternative novel methods. Meat Sci 2014;97(3):298-309.
3. Sandasi M, Leonard CM, Van Vuuren SF, Viljoen AM. Peppermint (Mentha piperita) inhibits microbial biofilms in vitro. South African Journal of Botany 2011;77(1):80-5.
4. Valeriano C, de Oliveira TLC, de Carvalho SM, Cardoso MdG, Alves E, Piccoli RH. The sanitizing action of essential oil-based solutions against Salmonella enterica serotype Enteritidis S64 biofilm formation on AISI 304 stainless steel. Food Control 2012;25(2):673-7.
5. Costerton JW, Cheng K, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M, *et al*. Bacterial biofilms in nature and disease. Annu Rev Microbiol 1987;41(1):435-64.
6. Adabi M, Talebi Taher M, Arbabi L, Afshar M, Fathizadeh S, Minaeian S, *et al*. Determination of antibiotic resistance pattern of Pseudomonas aeruginosa strains isolated from patients with burn wounds. J Ardabil Univ Med Sci 2015;15(1):66-74.

[۱] Colvin

[۲] Sakuragi

www.SID.ir

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 11:31 IRDT on Saturday July 13th 2019

7. Arora DS, Kaur J. Antimicrobial activity of spices. Int J Antimicrob Agents 1999;12(3):257-62.
8. Zhou S, Koh H-L, Gao Y, Gong Z-y, Lee EJD. Herbal bioactivation: The good, the bad and the ugly. Life Sci 2004;74(8):935-68.
9. Kok CR, Yang J, Ciftci O, Hutkins R. Antibacterial effects of peppermint, Mentha piperita essential oil in free-form and in nanoparticles on Pseudomonas fluorescens. 2016. Available from: https://digitalcommons.unl.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1105&context=ucareresearch
10. Ahmed A. Antibacterial activity of Mentha piperita and Allium sativum against some of gram-ve bacteria. Al-Mustansiriyah J Sci 2012;23(5):39-48.
11. McKay DL, Blumberg JB. A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (Mentha piperita L.). Phytother Res 2006;20(8):619-33.
12. Friedman M, Henika PR, Mandrell RE. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against Campylobacter jejuni, Escherichia coli, Listeria monocytogenes, and Salmonella enterica. J Food Prot 2002;65(10):1545-60.
13. Friedman L, Kolter R. Genes involved in matrix formation in Pseudomonas aeruginosa PA14 biofilms. Mol Microbiol 2004;51(3):675-90.
14. Vasseur P, Vallet-Gely I, Soscia C, Genin S, Filloux A. The pel genes of the Pseudomonas aeruginosa PAK strain are involved at early and late stages of biofilm formation. Microbiology 2005;151(3):985-97.
15. Colvin KM, Irie Y, Tart CS, Urbano R, Whitney JC, Ryder C, *et al*. The Pel and Psl polysaccharides provide Pseudomonas aeruginosa structural redundancy within the biofilm matrix. Environ Microbiol 2012;14(8):1913-28.
16. Sakuragi Y, Kolter R. Quorum-sensing regulation of the biofilm matrix genes (pel) of Pseudomonas aeruginosa. J Bacteriol 2007;189(14):5383-6.
17. Baltch AL, Smith RP (eds): Pseudomonas aeruginosa infections and treatment. NewYork, NY, Marcel Dekker, 1994.
18. Chanawong A, M'zali FH, Heritage J, Lulitanond A, Hawkey PM. SHV-12, SHV-5, SHV-2a and VEB-1 extended-spectrum β-lactamases in Gram-negative bacteria isolated in a university hospital in Thailand. J Antimicrob Chemother 2001;48(6):839-52.
19. Chaudhari V, Gunjal S, Mehta M. Antibiotic resistance patterns of Pseudomonas aeruginosa in a tertiary care hospital in Central India. Int J Med Sci Public Health 2013;2(2):386-9.
20. Eriksen H, Iversen B, Aavitsland P. Prevalence of nosocomial infections in hospitals in Norway, 2002 and 2003. J Hosp Infect 2005;60(1):40-5.
21. Johnson JM, Church GM. Alignment and structure prediction of divergent protein families: periplasmic and outer membrane proteins of bacterial efflux pumps. J Mol Biol 1999;287(3):695-715.
22. Schümann J, Bluethmann H, Tiegs G. Synergism of Pseudomonas aeruginosa exotoxin A with endotoxin, superantigen, or TNF results in TNFR1-and TNFR2-dependent liver toxicity in mice. Immunol Lett 2000;74(2):165-72.
23. Valle DL, Andrade JI, Puzon JJM, Cabrera EC, Rivera WL. Antibacterial activities of ethanol extracts of Philippine medicinal plants against multidrug-resistant bacteria. Asian Pac J Trop Biomed 2015;5(7):532-40.
24. Nyenje ME, Green E, Ndip RN. Biofilm formation and adherence characteristics of Listeria ivanovii strains isolated from ready-to-eat foods in Alice, South Africa. The Scientific World Journal 2012.
25. Moskowitz SM, Foster JM, Emerson J, Burns JL. Clinically feasible biofilm susceptibility assay for isolates of Pseudomonas aeruginosa from patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol 2004;42(5):1915-22.
26. Jabalameli F, Mirsalehian A, Khoramian B, Aligholi M, Khoramrooz SS, Asadollahi P, *et al*. Evaluation of biofilm production and characterization of genes encoding type III secretion system among Pseudomonas aeruginosa isolated from burn patients. Burns 2012;38(8):1192-7.
27. Van Delden C, Iglewski BH. Cell-to-cell signaling and Pseudomonas aeruginosa infections. Emerg Infect Dis 1998;4(4):551.
28. Farzaei L, Azizi A, Arji I, Rostami R. bioactive potential of peppermint extract against some human bacterial and fungal pathogens. Avicenna J Clin Microbiol Infect 2015;2(4):e29693.

www.SID.ir

29. Pulipati S, Koushik OS, Babu PS. Phytochemical Analysis and Antibacterial Efficacy of Mentha piperita (L) Ethanolic Leaf Extract against Clinical Isolates of Uropathogens. BMRJ 2016;13(6):1-5.
30. Niculae M, Spînu M, Şandru CD, Brudaşcă F, Cadar D, SZAKACS B, *et al*. Antimicrobial potential of some Lamiaceae essential oils against animal multiresistant bacteria. Lucrări Scintifice Medicină Veterinară Timoara. 2009;42:170-5.
31. Ceylan O, Ugur A, Sarac N, Sahin MD. The antimicrobial and antibiofilm activities of *Mentha x piperita* L. essential oil. J BioSci Biotech 2014:23-7. Available from: http://www.jbb.uni-plovdiv.bg/documents/27807/728057/SE-2014-23-27.pdf
32. Lang M, Rodrigues S, Boulho R, Duteil E, Bazire A, Bedoux G. An Essential Oil Blend Prevents Pseudomonas aeruginosa PA01 from Forming Biofilms. J Bacteriol Parasitol. 2016;7(2):1000268.

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 11:31 IRDT on Saturday July 13th 2019

www.SID.ir

Archiv

Journal of Neyshabur University of Medical Sciences

www.journalnums.ac.ir

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 11:31 IRDT on Saturday July 13th 2019

Anti-biofilm effect of peppermint extract on *Pseudomonas aeruginosa* that isolated of hospitalized patients in Tabriz city

Paria Vaghari[1], Mansoor Aletaha[1,2*]

1- Department of Biology, Faculty of Graduate Studies, Bonab Branch, Islamic Azad University, Bonab, Iran.
2- Department of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Original Article

Received: Nov 4, 2018
Accepted: Feb 2, 2019

***Corresponding Author:**
Mansoor Aletaha, Bonab, Laleh Blvd, Bonab Islamic Azad University, Graduate College, Biology Department
TEL: +9841 37738893
Email:
manal239@yahoo.com

ABSTRACT

Introduction
Biofilms may form on living or non-living surfaces and can be prevalent in natural, industrial and hospital settings. *Pseudomonas aeruginosa* is a pathogenic agent and has a high potential for biofilm formation. A study on herbal medicines to control biofilms is of particular importance. The aim of this study is to determine the effect of peppermint extract on bacterial and biofilm *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical specimens and determining the frequency of the *pelF* gene and its association with biofilm formation.

Materials and Methods
208 clinical specimens were collected. The extract of peppermint was extracted and then, its effect on the growth of *Pseudomonas aeruginosa* was evaluated. The MIC and MBC of the extract were determined. The appropriate time and intensity of biofilm formation as weak, moderate and strong were determined and the lowest concentration of biofilm formation inhibition (BIC) by peppermint extract was determined. Then the presence of *pelF* gene was tested by PCR.

Results
Peppermint extract caused the formation of a non-growth halo on *Pseudomonas aeruginosa* bacteria. MIC and MBC concentrations of peppermint extract were determined to be 50 and 100 mg/ml respectively. The time for biofilm formation was 48 hours and biofilm inhibitory concentration (BIC) extract of peppermint was obtained at 50 mg/ml. One hundred percent of the isolated samples had *PelF* gene and this gene showed a significant relationship with biofilm formation (P=0.0001).

Conclusion
It is possible to use mint extract in various compositions to inhibit Pseudomonas aeruginosa and inhibit biofilm formation.

Keywords
Pseudomonas aeruginosa, biofilm, peppermint extract, *PelF* gene, PCR

► ***Please cite this article as:*** Vaghari P, Aletaha M. Anti-biofilm effect of peppermint extract on Pseudomonas aeruginosa that isolated of hospitalized patients in Tabriz city. J Neyshabur Univ Med Sci 2019;7(2):73-87.

www.SID.ir