Archive of SID

Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 13, Number 2 (May - June)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Antimicrobial Effect of Combined Extract of Three Plants *Camellia Sinensis*, *Teucrium Polium* and *Piper Nigrum* on Antibiotic Resistant Pathogenic Bacteria

Fatemeh Masoumipour, Mehdi Hassanshahian, Hosseinali Sasan*, Tayebeh Jafarinasab

Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

Article Information

Article Subject:
Antibiotic Resistance

DOI:

Corresponding author:

Hosseinali Sasan,
Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

Email:
hsasa@uk.ac.ir

Use your device to scan and read the article online

Abstract

Background and Aims: Microbial biofilms are responsible for 65% of human infections and antibiotic resistance. Therefore, finding appropriate ways to prevent infection and biofilm formation is essential. Medicinal plants are one of the suitable candidates to inhibit the antibiotics resistance particularly in biofilm forms. In this study, antimicrobial effects of T.C.P combined extracts (methanolic and ethanolic) were evaluated for 6 antibiotic resistant bacteria in planktonic and biofilm forms.

Materials and Methods: The antibacterial activity of extracts on planktonic and biofilm form of antibiotic resistant bacteria, were evaluated by disk diffusion method, macrobroth dilution technique and microtiter plate method.

Results: According to disc diffusion test (MBC and MIC), extracts were efficient for inhibition of planktonic forms of bacteria. Although the ethanolic extract was more effective compared to the methanol extract. The T.C.P combined extracts could inhibit biofilm formation and destruct synthetized biofilms. Inhibitory effects on metabolic activity of bacteria had a direct association with the concentration of extract. The maximum inhibitory effects of T.C.P combined extracts on biofilm formation, destruction of synthetized biofilms and inhibition of metabolic activity were observed for *S. aureus*, (98.13%), *S. aureus*, (96.3%) and *E. coli* (81.16%) respectively.

Conclusion: T.C.P combined extracts can be used as an alternative component with inhibitory antibiotic resistant bacteria in planktonic and biofilm form.

Keywords: Biofilm, Medicinal plants, Antibiotic resistant, Antibacterial activity

Received: 2017/10/09 Accepted: 2019/07/22 Available online: 2019/08/23

Copyright © 2019. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution- 4.0 International License which permits Share, copy and redistribution of the material in any medium or format or adapt, remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially.

How to cite this article:

Masoumipour F, Hassanshahian M, Sasan H, Jafarinasab T. Antimicrobial Effect of Combined Extract of Three Plants Camellia Sinensis, Teucrium Polium and Piper Nigrum on Antibiotic Resistant Pathogenic Bacteria. Iran J Med Microbiol. 2019; 13 (2) :114-124

www.SID.ir

Archive of SID

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۳ ـ شماره ۲ ـ خرداد و تیر ۱۳۹۸

Journal homepage: www.ijmm.ir

بررسی اثر ضدباکتریایی عصارۀ ترکیبی سه گیاه کلپوره، فلفل سیاه و چای سبز بر باکتری‌های پاتوژن مقاوم به آنتی‌بیوتیک

فاطمه معصومی‌پور، مهدی حسن شاهیان، حسینعلی ساسان*، طیبه جعفری‌نسب

گروه زیست‌شناسی، دانشکدۀ علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچۀ مقاله

دریافت: ۱۳۹۶/۰۷/۱۷

پذیرش: ۱۳۹۸/۰۴/۳۱

انتشار آنلاین: ۱۳۹۸/۰۶/۰۱

موضوع:

مقاومت پادزیستی (آنتی بیوتیکی)

IJMM1398;13(2): 114-124

نویسندۀ مسئول:

حسینعلی ساسان

گروه زیست‌شناسی، دانشکدۀ علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

پست الکترونیک:

hsasa@uk.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: بیوفیلم‌های میکروبی علت ۶۵ درصد از عفونت‌های انسانی و مقاومت آنتی‌بیوتیکی هستند. بنابراین یافتن راهی مناسب برای جلوگیری از عفونت‌ها وتشکیل بیوفیلم ضروری است. گیاهان دارویی، بهترین کاندید برای مهار مقاومت آنتی‌بیوتیکی به‌ویژه در فرم بیوفیلم هستند. در این پژوهش اثر ضدمیکروبی عصارۀ ترکیبی سه گیاه کلپوره، چای سبز و فلفل سیاه (T.C.P) (متانولی و اتانولی) بر ۶ باکتری مقاوم به آنتی‌بیوتیک به صورت منفرد و بیوفیلم بررسی شد.

مواد و روش‌کار: فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌ها بر فرم منفرد و بیوفیلم باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک، به کمک روش انتشار دیسک، ماکروبراث دایلوشن و میکروپلیت تیتر صورت گرفت.

یافته‌ها: با توجه به آزمون انتشار دیسک (MBC و MIC)، عصاره‌ها بر فرم منفرد باکتری‌ها اثر مهاری داشتند. با این حال عصاره اتانولی اثربخشی بیشتری نسبت به عصاره متانولی داشت. قابلیت عصاره‌ها در مهار تشکیل بیوفیلم، تخریب بیوفیلم تشکیل‌شده و جلوگیری از فعالیت متابولیک باکتری‌ها به طور مستقیم با غلظت ارتباط داشت. بیشترین اثر مهاری عصاره اتانولی ترکیبی T.C.P در تشکیل بیوفیلم، تخریب بیوفیلم تشکیل‌شده و مهار فعالیت متابولیک باکتری در بیوفیلم به ترتیب روی باکتری‌های *S. aureus* (۹۸/۱۳ درصد)، *S. aureus* (۹۶/۳ درصد) و *E. coli* (۸۱/۱۶ درصد) مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش، عصارۀ ترکیبی T.C.P را می‌توان به عنوان ترکیبی جایگزین با قابلیت مهار باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در فرم منفرد و بیوفیلم استفاده کرد.

کلمات کلیدی: بیوفیلم، گیاهان دارویی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، اثر ضدمیکروبی

کپی‌رایت © مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده غیرتجاری با ذکر منبع آزاد است.

مقدمه

بیماری‌های عفونی، بیماری‌های گسترده و شایع در جهان هستند که هزینه‌های فراوانی را به جوامع بشری تحمیل می‌کنند و تهدیدی برای سلامت بشر محسوب می‌شوند. میزان مرگ و میر ناشی از این بیماری‌ها روزبه‌روز در جهان، به‌خصوص در کشورهای در حال توسعه رو به افزایش است. یکی از راه‌های اصلی درمان بیماری‌های عفونی، استفاده از آنتی‌بیوتیک است. امروزه با افزایش استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های رایج درمانی، مقاومت گونه‌های میکروبی بیماری‌زا، در حال شیوع و گسترش روزافزون است (۳-۱). یکی از دلایل مقاومت باکتری‌ها تشکیل ساختارهای بیوفیلمی است که به معظل شدید عفونت‌ها تبدیل شده است. بیوفیلم، اجتماعی از سلول‌های میکروبی است که با یک ماتریکس خارج سلولی شامل اگزوپلی ساکارید، پروتئین و DNA محصور شده‌اند و این ماتریکس نقش حفاظتی از سلول را در برابر عوامل مختلف بر عهده دارد که مانع از نفوذ ترکیبات ضدمیکروبی و عملکرد مناسب آن‌ها می‌شود؛ به طوری که برخی از محققان ادعا می‌کنند مقاومت بیوفیلمی باکتری‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک هزاران برابر بیشتر از فرم منفرد باکتریایی است (۸-۴). در سال‌های اخیر، اهمیت بیوفیلم در ایجاد بیماری‌ها، گسترش مقاومت‌های میکروبی و اثرات جانبی مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها باعث شده است محققان به منظور دستیابی به ترکیبات ضدمیکروبی جدید، به‌ویژه در فرم بیوفیلم میکروب‌ها، از ترکیبات طبیعی مانند عصاره‌های گیاهی استفاده کنند. گیاهان دارویی، بهترین کاندید برای مهار باکتری-های عفونت‌زای مقاومت به آنتی‌بیوتیک هستند که از مزایای آن

www.SID.ir

Archive of SID

می‌توان به کم‌بودن هزینهٔ تولید، عوارض جانبی کم، نداشتن مشکلات زیست‌محیطی اشاره کرد (۹، ۲).

گیاهان دارویی با داشتن متابولیت‌های ثانویه فراوان، مواد مؤثر اولیه بسیاری از داروها را دارند. در نتیجه این گیاهان می توانند به عنوان یکی از مهم‌ترین منابع دارویی با اثرات ضدباکتریایی و ضدقارچی جدید شمرده شوند (۱۲-۱۰). این گیاهان از طریق تحریک سیستم ایمنی، فعالیت ضدالتهابی و ضداکسیدانی، افزایش هضم و جذب مواد غذایی و فعالیت‌های ضدباکتریایی، ضدقارچی و ضدانگلی در درمان بسیاری از بیماری-ها به کارمی‌روند (۱۴، ۱۳). ایران به علت آب و هوای متنوع و وسعت زیاد تنوع زیادی از گیاهان دارویی را دارد که اساس و پایهٔ طب سنتی کشور را تشکیل می‌دهد.

در این پژوهش اثر ضدمیکروبی سه گیاه دارویی شامل کلپوره، چای سبز و فلفل سیاه بررسی شد (۱۵). کلپوره با نام علمی *Teucrium polium* متعلق به تیره *Lamiaceae*، گیاهی علفی با ظاهری سفید و پنبه‌ای است. از این گیاه به عنوان ضدباکتری، ضدالتهاب، کاهش قند و چربی خون استفاده می‌شود. این گیاه حاوی ترکیبات زیادی از جمله تانن، ترپنوئید، ساپونین، استرول، فلاونویید و لوکوآنتوسیانین است که می‌توان از عصارهٔ این گیاه در درمان بسیاری از بیماری‌ها بهره برد (۱۸-۱۶). بیشتر ترکیبات مؤثر این گیاه در حلّال‌های قطبی مثل الکل‌ها قابلیت انحلال دارند.

چای سبز با نام علمی *Camellia sinensis* متعلق به تیره *Theaceae*، از رایج‌ترین گیاهان دارویی پرمصرف در جهان است که در محصولات آرایشی، دارویی و غذایی کاربرد دارد (۱۹). از مهم‌ترین ترکیبات موجود در این گیاه می‌توان به فلاونوئیدها به‌ویژه کاتچین‌ها اشاره کرد که اثرات مفیدی از جمله کاهش خطرات بیماری‌های قلبی و عروقی، کاهش بروز بعضی از سرطان-ها، کاهش فشار خون، کنترل وزن بدن، خاصیت پری‌بیوتیکی، آنتی‌اکسیدانی، ضدمیکروبی و ضدویروسی، محافظت در برابر نور خورشید، افزایش تراکم استخوان و تأثیر مثبت بر عملکرد سیستم عصبی دارد (۲۲-۲۰).

فلفل سیاه با نام علمی *Piper nigrum* متعلق به تیره *Piperaceae*، یکی از گیاهان دارویی است که در جنوب هند و سایر مناطق گرمسیری کشت می‌شود. این گیاه دارویی دارای ترکیباتی شامل آلفا و بتا پینن‌ها، لینالئول و ترپینئول است که خواص ضدعفونی‌کننده، ضدباکتریایی، تب‌بر دارد و در درمان بیماری قلبی، گرفتگی سینه، سوء هاضمه، گزش حشرات، بی‌خوابی، درد مفاصل، بیماری ریوی، آبله دهانی، آفتاب‌زدگی و دندان درد استفاده می‌شود (۲۴، ۲۳). بیشتر مطالعات انجام‌شده در رابطه با عصاره‌های این سه گیاه دارویی، بیشتر بر فرم منفرد باکتری انجام شده است. از این رو در پژوهش حاضر فعالیت ضدباکتریایی عصارهٔ ترکیبی (متانولی و اتانولی) سه گیاه دارویی (کلپوره، فلفل سیاه و چای سبز) در شهر کرمان علیه باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک شامل *Escherichia coli*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Bacillus cereus*، *Staphylococcus aureus*، *Acinetobacter baumannii*، *Klebsiella pneumonia* در فرم بیوفیلم و منفرد بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری، شناسایی و استخراج عصاره

گیاه تازهٔ چای سبز (برگ)، فلفل سیاه (میوه) و کلپوره (گل) از حومهٔ شهر کرمان جمع‌آوری و پس از شناسایی و تأیید توسط کارشناس گیاه‌شناسی بخش گیاهی دانشگاه شهید باهنر کرمان، شسته شد. سپس بخش‌های مورد استفادهٔ آن به طور جداگانه روی کاغذ پهن و در دمای ۳۵ درجه به مدت سه روز خشک شدند. نمونه‌های خشک‌شده با استفاده از هاون و مخلوط‌کن برقی پودر شدند. به منظور عصاره‌گیری از روش ماسراسیون تغییریافته استفاده شد که طی آن پودر هر گیاه به ترتیب با حلّال‌های آلی متانولی (۹۶ درصد) و اتانولی (۸۰ درصد) با نسبت جرمی-حجمی ۱:۱۰ مخلوط شد و در دمای ۴۰ درجه به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در انکوباتور شیکردار مرتب هم زده شد. برای حذف قطعات درشت گیاهی از کاغذ واتمن شماره ۱ استفاده و محلول حاصل برای حذف حلّال اضافی به دستگاه روتاری منتقل شد. سپس محلول در انکوباتور ۴۰ درجه به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت قرار گرفت تا پودر خشکی از عصاره به دست آید که این پودر تا زمان استفاده در ظرف‌های شیشه‌ای تیره و در دمای ۴- درجه نگهداری شد (۲۵).

میکروارگانیسم‌های مطالعه‌شده و محیط کشت

در این پژوهش ۲ باکتری گرم مثبت (*Staphylococcus aureus* ATCC 1189 و *Bacillus cereus* ATCC 1298) و ۳ باکتری گرم منفی (*Escherichia coli* ATCC 35218، *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853، *Acinetobacter baumannii* ATCC 1611، *Klebsiella pneumonia* ATCC 700603) از آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی کرمان تهیه شد. میکروارگانیسم‌ها در دمای ۸۰- درجه سلسیوس در محیط نوترینت براث در گلیسرول ۲۰ درصد نگهداری شدند. از محیط کشت مولر هینتون آگار برای انتشار در دیسک، MIC و MBC استفاده شد.

www.SID.ir

Archive of SID

بررسی اثر ضدمیکروبی عصارهٔ گیاهی به روش انتشار دیسک

فعالیت ضدمیکروبی عصاره خام با استفاده از روش انتشار دیسک بوئر کربی بررسی شد. به طور خلاصه بعد از کشت یک‌شبه باکتری‌ها تا رسیدن به کدورت ۱/۵ ×۱۰۸ cfu/mL رقیق شد. دیسک‌های بلانک ۶ میلی‌متری درون محلول عصاره با غلظت ۱۰۰ mg/mL به مدت یک ساعت غوطه‌ور شدند. سپس به کمک پنس استریل دیسک‌های حاوی عصاره (۱۰۰ mg/mL) درون یک پلیت استریل قرار گرفتند تا در دمای محیط خشک شوند. نحوه سنجش میزان عصارهٔ موجود در هر دیسک نیز بدین صورت بود که مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم از عصارهٔ خشک‌شده در یک سی‌سی متانول یا اتانول حل شد و سپس دیسک‌ها در این محلول به مدت یک ساعت فرو برده شدند. وزن دیسک‌ها قبل از فروبردن در محلول یادداشت شد. سپس دیسک‌ها از محلول بیرون آورده و در دمای اتاق خشک و دوباره وزن شدند. میزان جذب عصاره بر اساس اختلاف وزن و گراویمتری محاسبه شد. در نهایت دیسک های تهیه‌شده با فاصلهٔ منظم روی محیط قرار گرفت و پلیت‌های حاوی باکتری به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شدند. دیسک حاوی اتانول و متانول به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. قطر هاله عدم رشد دیسک‌ها به کمک خط‌کش میلی‌متری اندازه‌گیری شد (۲۶).

تعیین حداقل غلظت مهاری و حداقل غلظت کشندگی عصاره

مقادیر MIC و MBC عصارهٔ ترکیبی T.C.P با روش ماکروبراث دایلوشن و طبق برنامه European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) انجام شد. در این روش ۱۰ رقت از محلول عصاره اتانولی و متانولی با روش رقیق‌سازی متوالی تهیه و برای تعیین Minimum Inhibitory Concentration (MIC) و Minimum Bactericidal Concentration (MBC) به کار رفت. سپس ۱ میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتری ۲۴ ساعته به کدورت 5×10^5 در محیط کشت نوترینت براث به هر رقت (۱ میلی‌لیتر) اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند. باکتری به همراه محیط کشت نوترینت براث به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. لوله‌ها با کدورت کنترل مقایسه و کمترین غلظتی که رشد باکتری مهارشده داشت، به عنوان MIC در نظر گرفته شد. برای تعین MBC هر یک از عصاره‌ها بدین صورت عمل شد که رقت‌هایی از MIC که هیچ کدورت قابل مشاهده‌ای نداشتند انتخاب شدند. میزان ۱۰۰ میکرولیتر از این رقت‌ها روی محیط نوترینت آگار به روش سفره‌ای کشت داده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شد. در نهایت کمترین غلظتی که باکتری پس از انکوباسیون ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس رشد نکرد، به عنوان MBC تعیین شد (۲۷).

قابلیت تشکیل بیوفیلم به وسیلهٔ سویه‌ها

قابلیت تشکیل بیوفیلم به وسیلهٔ سویه‌ها با روش O'Toole and Kolter بررسی شد.

قابلیت عصاره در ممانعت از تشکیل بیوفیلم

تشکیل بیوفیلم توسط O'Toole و Kolter (۲۸) با اندکی تغییرات بررسی شد. ابتدا سه رقت mg/mL ۲۵-۶/۲۵ از عصارهٔ اتانولی و متانولی تهیه و ۱۰۰ میکرولیتر آن به چاهک میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای اضافه شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی به چاهک اضافه شد و پلیت‌ها برای ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند. چاهک حاوی TSB و آب استریل به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. پس از انکوباسیون میکروتیتر پلیت ۳ مرتبه با بافر فسفات سالین((Phosphate-Buffered Saline (PBS) شسته شد. سپس ۱۵۰ میکرولیتر متانول ۹۶ درصد برای تثبیت سلول‌های چسبیده اضافه شد و بعد از حذف متانول، ۲۰۰ میکرولیتر کریستال ویوله ۱ درصد به چاهک اضافه و برای ۵ دقیقه در دمای ۳۰ درجه انکوبه شد. در آخر ۱۶۰ میکرولیتر اسید استیک گلاسیال ۳۳ درصد به چاهک اضافه و جذب نوری با دستگاه الایزا ریدر (India , Biotec, ELX-800) در طول موج ۶۳۰ نانومتر خوانده شد.

$$M=100\times\{(A-B)-(C-D) / (A-B)\}$$

M: درصد مهار تشکیل بیوفیلم، A: میانگین جذب نوری کنترل، B : میانگین جذب نوری کنترل محیط کشت، C: میانگین جذب نوری چاهک آزمون، D: میانگین جذب نوری کنترل عصاره (۲۹).

قابلیت عصاره در تخریب ساختارهای بیوفیلمی تشکیل‌شده

برای تشکیل بیوفیلم‌ها، ۱۰۰ میکرولیتر از کشت‌های باکتریایی در محیط TSB در چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوباتور شدند. پس از تشکیل بیوفیلم، محیط به‌آرامی خالی شد و سلول‌های غیرچسبنده با شستن بیوفیلم‌ها توسط PBS (۲ مرتبه) استریل حذف شدند. برای بررسی اثر عصاره بر روی بیوفیلم از قبل تشکیل‌شده، هر عصاره به غلظت‌های مختلف mg/mL (۲۵-۶/۲۵) به چاهک‌ها اضافه و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شد. مهار بیوفیلم تشکیل‌شده با رنگ‌آمیزی بنفش کریستالی تجزیه و تحلیل شد. درصد کاهش ساختارهای بیوفیلم در حضور غلظت‌های مختلف عصاره‌ها با استفاده از فرمول $M=100\times\{(A-B)-(C-D) / (A-B)\}$ محاسبه شد (۳۰).

قابلیت عصاره بر فعالیت آنزیم دهیدروژناز

Hoiby و همکاران (۲۰۱۰) تأثیر عصاره بر فعالیت متابولیک بیوفیلم تشکیل‌شده را با اندکی تغییرات گزارش کرده‌اند. به طور

www.SID.ir

Archive of SID

خلاصه، بیوفیلم‌های ساخته‌شده از قبل ابتدا ۲ مرتبه با PBS شسته شدند، سپس عصاره با غلظت‌های مختلف (۶/۲۵-۲۵ mg/mL) اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوباتور شدند. بعد از انکوباسیون،۵۰ میکرولیتر از محلول تری فنیل تترازولیوم کلراید(Triphenyl Tetrazolium Chloride (TTC)) به هر چاهک اضافه شد و به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند. سپس جذب نهایی در ۴۹۰ نانومتر با استفاده دستگاه الایزا ریدر (India , Biotec, ELX-800) در طول موج ۶۳۰ نانومتر خوانده شد. درصد کاهش فعالیت متابولیک بیوفیلم در حضور غلظت‌های مختلف عصاره‌ها با استفاده از فرمول M=100×{(A-B)-(C-D) / (A-B)} محاسبه شد (۳۱).

تحلیل آماری یافته‌ها

تمام آزمون‌ها با سه بار تکرار انجام شد و اختلاف میان داده‌ها با استفاده از تحلیل واریانس (ANOVA) و SPSS نسخه ۱۸ برای ویندوز و در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ بررسی شد.

یافته‌ها

اثرات مهاری عصارهٔ ترکیبی در برابر فرم منفرد باکتری‌های

میانگین قطر هاله مهاری، مقادیر MIC و MBC عصارهٔ ترکیبی T.C.P در جدول ۱ آورده شده است. بر اساس مشاهدات انجام‌شده باکتری *سودوموناس ائروزینوزا* بیشترین حساسیت (۲۱±۱/۱۲) و باکتری *کلبسیلا پنومونیه* کمترین حساسیت (۸±۰/۸۹) را به عصاره متانولی نشان داد.

مقادیر MIC و MBC برای ترکیب T.C.P بر باکتری‌های مطالعه‌شده در محدوده غلظتی ۲۵-۵۰mg/mL به دست آمد. MIC برای عصاره متانولی بر *باسیلوس سرئوس* و *سودوموناس ائروزینوزا* و برای عصاره اتانولی باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی* مشاهده نشد. MBC برای عصاره اتانولی باکتری *سودوموناس ائروزینوزا* و *کلبسیلا پنومونیه* و عصاره متانولی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اسینتوباکتر بومانی* دیده نشد.

جدول ۱. میانگین قطر هاله مهاری (mm) مقادیر MIC و MBC عصارهٔ ترکیبی(mg/ml) T.C.P

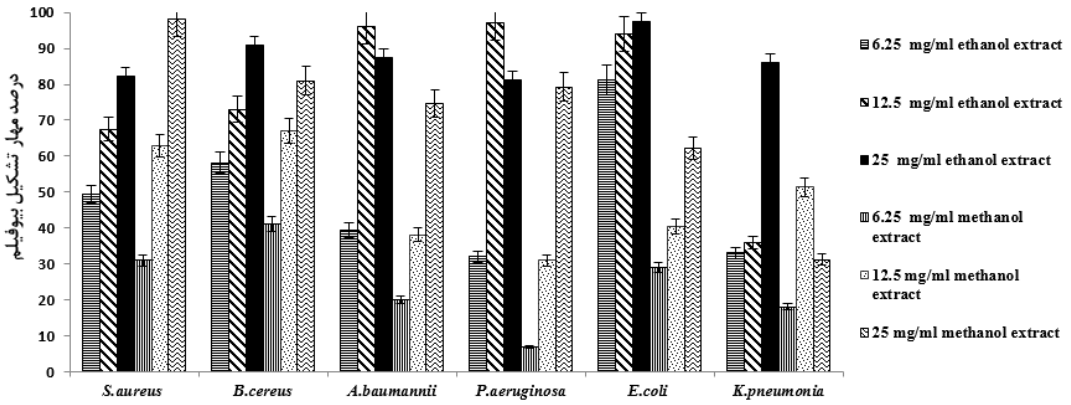
باکتری‌ها	میانگین±انحراف معیار قطر هاله مهاری		MIC		MBC	
	عصاره متانولی (mg/mL)	عصاره اتانولی (mg/mL)	عصاره متانولی (mg/mL)	عصاره اتانولی (mg/mL)	عصاره متانولی (mg/mL)	عصاره اتانولی (mg/mL)
استافیلوکوکوس اورئوس	۹±۰/۲۳	۲۰±۰/۷۷	۵۰±۱/۲۳	۰	۰	۲۵±۰/۷۶
باسیلوس سرئوس	۱۵±۰/۸۷	۱۰±۱/۰۳	۰	۲۵±۰/۳۲	۲۵±۰/۶۳	۵۰±۰/۹۴
سودوموناس ائروزینوزا	۲۱±۱/۱۲	۱۸±۰/۳۵	۰	۵۰±۰/۲۸	۲۵±۱/۷۶	۰
اسینتوباکتر بومانی	۱۱±۰/۷۶	۱۲±۰/۶۷	۲۵±۰/۸۳	۲۵±۰/۸۷	۰	۵۰±۰/۷۸
اشریشیا کلی	۹±۱/۴۳	۱۰±۱/۶۵	۲۵±۰/۶۴	۰	۵۰±۰/۵۶	۵۰±۰/۵
کلبسیلا پنومونیه	۸±۰/۸۹	۸±۱/۰۲	۲۵±۱/۰۳	۲۵±۱/۲۳	۵۰±۰/۹۶	۰

اثرات مهاری عصارهٔ ترکیبی T.C.P در برابر تشکیل بیوفیلم

قابلیت هریک از غلظت‌های مختلف عصارهٔ ترکیبی T.C.P بر تشکیل بیوفیلم در شکل ۱ نشان داده شده است. بر این اساس بیشترین مهار تشکیل بیوفیلم در تیمار با عصاره متانولی با غلظت ۲۵ mg/mL بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس* (۹۸/۱۳ درصد) و کمترین اثر مهاری مربوط به همین عصاره با غلظت ۶/۲۵ mg/mL بر روی سویه‌ی *سودوموناس ائروزینوزا* (۶/۹۱ درصد) مشاهده شد. اثر عصارهٔ ترکیبی T.C.P بر باکتری‌های مختلف در مهار تشکیل بیوفیلم معنی‌دار بوده است ($P<۰/۰۵$).

www.SID.ir

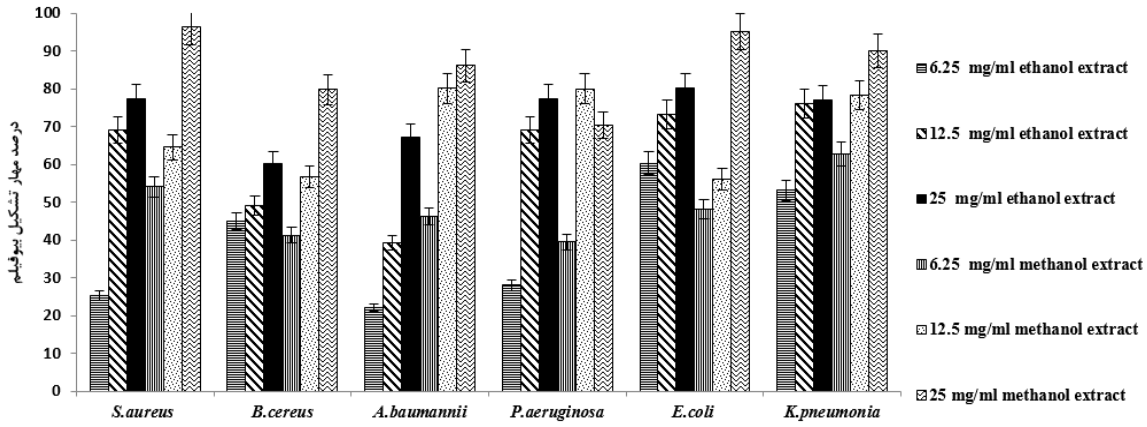
Archive of SID



شکل ۱. مقایسهٔ تأثیر عصارهٔ ترکیبی T.C.P بر تشکیل بیوفیلم باکتری‌ها

اثرات مهاری عصارهٔ ترکیبی در برابر تخریب بیوفیلم تشکیل شده

قابلیت هریک از غلظت‌های مختلف عصاره‌های ترکیبی T.C.P در تخریب ساختارهای بیوفیلمی بررسی‌شده در شکل ۲ آمده است. بیشترین تخریب ساختارهای بیوفیلمی در تیمار با عصاره متانولی در غلظت ۲۵ mg/mL بر روی سویه‌ی *استافیلوکوکوس اورئوس* (۹۶/۳ درصد) و کمترین تخریب مربوط به عصاره‌ی اتانولی در غلظت ۶/۲۵ mg/mL بر روی سویه‌ی *اسینتوباکتر بومانی* (۲۲/۰۸ درصد) مشاهده شد. اثر عصارهٔ ترکیبی T.C.P به صورت جداگانه معنی‌دار است ($P<۰/۰۵$).



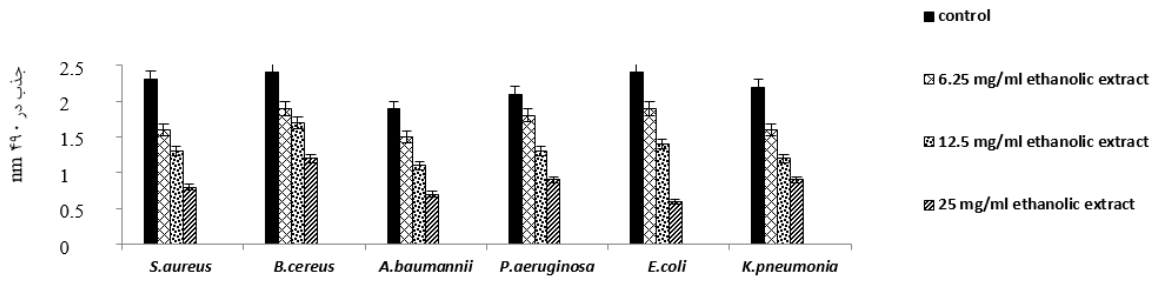
شکل ۲. مقایسهٔ تأثیر عصارهٔ ترکیبی T.C.P بر بیوفیلم تشکیل‌شدهٔ باکتری‌ها

اثرات مهاری عصارهٔ ترکیبی بر فعالیت آنزیم دهیدروژناز

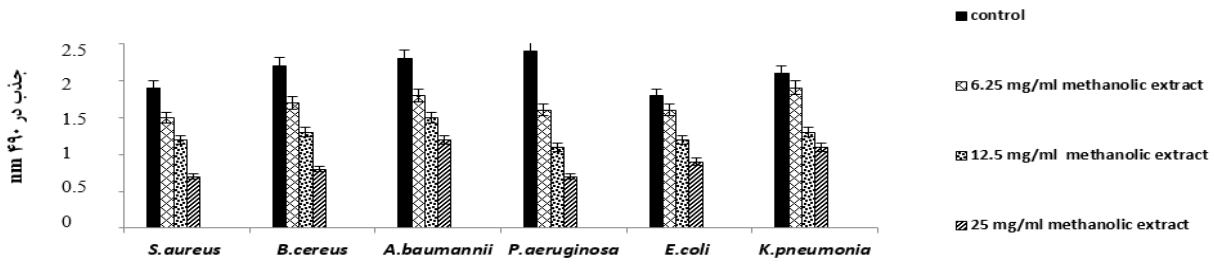
قابلیت هریک از غلظت‌های مختلف عصاره‌ی ترکیبی T.C.P بر فعالیت آنزیم دهیدروژناز باکتری‌های بررسی‌شده در شکل‌های ۳ و ۴ آمده است. بیشترین مهار فعالیت آنزیمی در تیمار با عصاره‌ی اتانولی و متانولی در غلظت ۲۵ mg/mL بر روی سویهٔ *اشریشیاکلی* (OD=۰/۶) و سودوموناس ائروزینوزا (OD=۰/۷) بود. همچنین کمترین مهار آنزیمی در تیمار با عصاره اتانولی در غلظت ۶/۲۵ mg/mL بر روی سویه‌های *اشریشیا کلی* و *باسیلوس سرئوس* (OD=۱/۹) و *کلبسیلا پنومونیه* (OD=۱/۹) مشاهده شد. اثر عصارهٔ ترکیبی T.C.P بر باکتری‌های مختلف بر فعالیت آنزیم دهیدروژناز معنی‌دار است ($P<۰/۰۵$).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳. مقایسهٔ تأثیر عصارهٔ اتانولی ترکیب T.C.P بر آنزیم دهیدروژناز باکتری‌ها



شکل ۴. مقایسهٔ تأثیر عصارهٔ متانولی ترکیب T.C.P بر آنزیم دهیدروژناز باکتری‌ها

بحث

امروزه یکی از دلایل اصلی ایجاد عفونت در انسان، مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌ها به علت مصرف آنتی‌بیوتیک است که موجب ظهور و گسترش سویه‌های باکتری مقاوم به آنتی‌بیوتیک می شود. بیش از ۸۰ درصد از باکتری‌های عفونت‌زا در انسان، ساختارهای بیوفیلمی تشکیل می‌دهند. بنابراین تلاش‌های فراوانی برای دستیابی به اطلاعات بیشتر در مورد مواد مؤثره موجود در گیاهان و کاربرد آن‌ها در درمان عفونت‌های مختلف و کنترل بیوفیلم در حال انجام است (۳۲-۳۴). استفاده از مواد ضدمیکروبی با پایهٔ گیاهی می‌تواند در کنترل تشکیل بیوفیلم و بیماری‌های عفونی نقش باارزشی ایفا کن؛ به طوری که ۸۰ درصد از مردم کشورهای توسعه‌یافته از گیاهان دارویی برای درمان بیماری‌های مختلف استفاده می‌کنند (۳۵).

اگرچه فعالیت ضدباکتریایی و ضدقارچی زیادی از عصاره‌های گیاهی گزارش شده است، ولی اثربخشی آنها در برابر باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک بسیار کم است. در همین راستا، در این مطالعه خواص ضدباکتریایی عصارهٔ ترکیبی T.C.P بر شش گونه باکتری مقاوم به آنتی‌بیوتیک بررسی شد. نتایج مطالعه حاضر در آزمون انتشار دیسک،MIC و MBC نشان می‌دهد عصارهٔ ترکیبی T.C.P توانایی زیادی در جلوگیری از رشد باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک دارد؛ به طوری که بیشترین قطر هاله عدم رشد عصاره اتانولی و متانولی ترکیب T.C.P مربوطه به باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* (mm ۲۰±۰/۷۷) و *سودوموناس ائروزینوزا* (mm ۲۱±۱/۱۲) بود. همچنین مقادیرMIC و MBC برای عصارهٔ ترکیبی T.C.P بر باکتری‌های مطالعه‌شده در محدودهٔ غلظتی mg/mL ۵۰-۲۵ به دست آمد که بیشترین غلظت مهارکنندگی عصاره اتانولی و متانولی به ترتیب مربوطه به باکتری *سودوموناس ائروزینوزا* (mg/mL ۵۰±۰/۲۸) و *استافیلوکوکوس اورئوس* (mg/mL ۵۰±۱/۲۳) به دست آمد.

در مطالعات Cui و همکارانش در سال ۲۰۱۲، Radji و همکارانش در سال ۲۰۱۳ و Liaqat و همکارانش در سال ۲۰۱۶، نتایج مشابهی اثر مهارکنندگی عصارهٔ چای سبز بر باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA))، *سودوموناس ائروزینوزا* مقاوم به چند دارو (Multi-drug resistant (MDR-*P. aeruginosa*) (*Pseudomonas aeruginosa*)، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس*، *سودوموناس ائروزینوزا*، *اشریشیا کلی* و *کلبسیلا پنومونیه* را تأیید می‌کند که این خاصیت را به طور کلی به ترکیبات پلی فنول درون عصارهٔ چای سبز در برابر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی مرتبط دانستند (۳۶-۳۸). همچنین مطالعات Darabpour و همکارانش در سال ۲۰۱۰ و Hatano و همکارانش در سال ۲۰۰۵ اثر مهاری عصارهٔ کلپوره بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین و باکتری‌های *باسیلوس سرئوس*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی* را تأیید

www.SID.ir

Archive of SID

می‌کنند (۳۹، ۴۰). Karsha و همکارانش در سال ۲۰۱۰ و Sabaghi و همکارانش در سال ۲۰۱۴ اثر بازدارندگی عصاره فلفل سیاه در برابر باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به آنتی‌بیوتیک، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس*، *سودوموناس ائروزینوزا*، *اشریشیا کلی* و *کلبسیلا پنومونیه* را نشان دادند. در مطالعات آنها این عصاره در غلظت‌های ۱۰، ۱/۲۵، ۲/۵۰، ۶/۲۵، ۱/۲۵ و ۱/۲۵ mg/mL بیشترین اثر بازدارندگی را داشت (۴۱،۴۲).

تفاوت میان اثربخشی عصاره در آزمون انتشار دیسک، MIC و MBC احتمالا به علت تفاوت در انتشار عصاره از دیسک‌های حاوی آن و انتشار در محیط مایع آزمون است. به طور کلی حلّال اتانولی به طور مؤثرتری نسبت به حلّال متانولی توانسته است با اجزا و مواد تشکیل‌دهندهٔ عصارهٔ ترکیبی T.C.P واکنش ایجاد کند و باعث افزایش خروج مواد مؤثر از گیاه و بالا رفتن غلظت این مواد در عصاره اتانولی نسبت به عصاره متانولی T.C.P شود. اثرات ضدباکتریایی این عصارهٔ ترکیبی ممکن است به خاطر ترکیبات موجود در عصاره باشد که میکروارگانیسم‌ها هرگز در معرض آن قرار نگرفته‌اند. بنابراین هرگز فرصتی برای ایجاد مقاومت نداشته‌اند. همچنین ترکیبات شناخته‌شده درون عصارهٔ این سه گیاه دارویی شامل پلی‌فنل‌ها، تانن‌ها، آلفا و بتا پینن‌ها و غیره می‌تواند باعث رسوب پروتئین‌های باکتری، مهار فعالیت آنزیمی، تخریب غشا و در نتیجه مرگ میکروارگانیسم شود (۴۳-۴۷).

گیاهان نقش مهمی در ازبین‌بردن شکل‌گیری بیوفیلم باکتری‌های بیماری‌زا دارند. ترکیبات عصارهٔ آن‌ها مانع از شکل‌گیری و توسعهٔ بیوفیلم می‌شود. در مطالعهٔ حاضر عصارهٔ ترکیبی T.C.P در مقابله با ساختار بیوفیلم کارآمد بود. اثر بازدارندهٔ عصاره به طور مستقیم با غلظت ارتباط دارد. توانایی عصارهٔ اتانولی در مهار بیوفیلم بیشتر از تخریب بیوفیلم یا جلوگیری از فعالیت متابولیک سلول میکروبی در ساختار بیوفیلم بود که می‌توان نتیجه گرفت عصاره اتانولی حاوی مولکولی است که با تشکیل بیوفیلم باکتری در ارتباط است، اما این عصاره توانایی کمی برای مقابله با ساختار بیوفیلم دارد. تفاوت بین نتایج مشاهدات ما احتمالا به دلیل مواد شیمیایی متنوع آن‌ها در گونه‌های مختلف گیاهی به‌ویژه در روش استخراج آنهاست. در مطالعات Agrawal در سال ۲۰۱۱ و Gibbons در سال ۲۰۰۴ نشان داده شد عصارهٔ چای سبز باعث مهار تشکیل بیوفیلم در باکتری‌های *اشریشیا کلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سودوموناس ائروزینوزا* می‌شود که مطابق با تحقیقات انجام‌شده است (۴۸،۴۹). همچنین گزارش شده است که عصارهٔ این گیاهان با اثرگذاری روی چسبندگی و سیستم کوئروم سنسینگ باکتری‌ها مانع از شکل‌گیری بیوفیلم می‌شود (۵۰).

براساس نتایج حاصل از این پژوهش، می‌توان نتیجه گرفت عصارهٔ ترکیبی T.C.P در شرایط آزمایشگاهی قابلیت مهار ۶ باکتری مقاوم به آنتی‌بیوتیک را دارد . بر این اساس می‌توان از این عصاره برای بهبود عملکرد آنتی‌بیوتیک‌ها یا حتی جایگزین آن‌ها استفاده کرد.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید باهنر کرمان به خاطر حمایت مالی صمیمانه سپاسگزاری می‌کنند.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

1. Mohsenipour Z, Hassanshahian M. Comparison of Antimicrobial Effects of Pomegranate Alcohol Extract on Single and Biofilm Form of Six Pathogenic Bacteria. Journal of Babol University of Medical Science. 2014; 17(1):77-84.
2. Mohsenipour Z, Hassanshahian, M. Antibacterial Activity of Euphorbia Hebecarpa Alcoholic Extracts Against Six Human Pathogenic Bacteria in Planktonic and Biofilm Forms. Jundishapur Journal of Microbiology. 2016; 9(6):e34701. [DOI:10.5812/jjm.34701] [PMID] [PMCID]
3. Sadeghian I, Hassanshahian, M, Sadeghian S, Jamali S. Antimicrobial Effects of Quercus Brantii Fruits on Bacterial Pathogens. Jundishapur Journal of Microbiology. 2012; 5(3):465-9. [DOI:10.5812/jjm.3376]
4. Mohammadi M, Masoumipour F, Hassanshahian M, Jafarinasab T. Study the antibacterial and antibiofilm activity of Carum copticum against antibiotic-resistant bacteria in planktonic and biofilm forms. Microbial Pathogenesis. 2019; 129:99-105. [DOI:10.1016/j.micpath.2019.02.002] [PMID]
5. Saeidi S, Amini Boroujeni N, Ahmadi H, Hassanshahian M. Antibacterial Activity of Some Plant Extracts Against Extended- Spectrum Beta-Lactamase Producing Escherichia coli Isolates. Jundishapur Journal of Microbiology. 2015; 8(2):e15434. [DOI:10.5812/jjm.15434] [PMID] [PMCID]
6. Mohsenipour Z, Hassanshahian M. The Inhibitory Effect of Thymus Vulgaris Extracts on the Planktonic

www.SID.ir

Archive of SID

Form and Biofilm Structures of Six Human Pathogenic Bacteria. Avicenna Journal Phytomedicine. 2015; 5(4):309-17.

7. Sepehri Z, Javadian F, Khammari D, Hassanshahian M. Antifungal Effects of the Aqueous and Ethanolic Leaf Extracts of Echinophora Platyloba and Rosmarinus Officinalis. Current Medical Mycology. 2016; 2(1):16-25. [DOI:10.18869/acadpub.cmm.2.1.30] [PMID] [PMCID]
8. Mohsenipour Z, Hassanshahian M, Moradi M. Investigations of Antimicrobial Activity of Eucalyptus Camaldulensis Extracts Against Six Pathogenic Bacteria in Planktonic Form and Biofilm. Journal of Kerman University of Medical Science. 2015; 22(2):172-84.
9. Masoumipour F, Hassanshahian M, Jafarinasab T. Antimicrobial Activity of Combined Extracts of Trachyspermum, Thymus and Pistachio Against Some Pathogenic Bacteria. Journal of Kerman University of Medical Science. 2018; 25(2):153-63.
10. Savithramma N, Linga Rao M, Suhrulatha D. Screening of Medicinal Plants for Secondary Metabolites. Middle East Journal Science Research. 2011; 8(3):579-84
11. Hassanshahian M, Bayat Z, Saeidi S, Shiri Y. Antimicrobial Activity of Trachyspermum Ammi Essential Oil Against Human Bacterial. International Journal Advance Biological Biomed Research. 2014; 2(1):18-24.
12. Chakraborty B, Nath A, Saikia H, Sengupta M. Bactericidal Activity of Selected Medicinal Plants Against Multidrug Resistant Bacterial Strains From Clinical Isolates. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. 2014; 7:435-41. [DOI:10.1016/S1995-7645(14)60271-6]
13. Saeidi S, Shiri Y, Bokaeian M, Hassanshahian M. Antibacterial Activity of Essential Oil of Saturejahortensis Against Multi-Drug Resistant Bacteria. International Journal Enteric Pathogen. 2013; 2(2):1-4. [DOI:10.17795/ijep16349]
14. Weinstine RA. Controlling Antimicrobial Resistance in Hospitals: Infection Control and Use Of Antibiotics. Emerging Infectious Diseases. 2001; 7(2):188-92. [DOI:10.3201/eid0702.010206] [PMID]
15. Bokaeian M, Sheikh M, Hassanshahian M, Saeidi S, Sahraei S. The Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Produced in the Plant Sesamum Indicum Seed Extract: A Green Method Against Multi-Drug Resistant Escherichia Coli. International Journal Enteric Pathogen. 2014; 2(2):e17928. [DOI:10.17795/ijep17928]
16. Rezaie Keikhaie K, Ghorbani S, Hosseinzadeh Z, Hassanshahian M. Antimicrobial Activity of Methanol Extract of Citrullus Colocynthis Against Antibiotic-Resistant Staphylococcus Aureus. Advance Herbal Medicine 2017; 3(3):1-6.
17. Hassanshahian M, Khosravi F. Study the Antimicrobial Effects of Artemisia Santonica Extract on Some Pathogenic Bacteria. Advance Herbal Medicine .2015; 1(4):43-6.
18. Mohsenipour Z, Hassanshahian M. Antibacterial activity of Espand (Peganum Harmala) Alcoholic Extracts Against Six Pathogenic Bacteria in Planktonic and Biofilm Forms. Biological Journal Microorganism. 2016; 4(16):47-57. [DOI:10.5812/jjm.34701] [PMID] [PMCID]
19. Javadian F, Sepehri Z, Saeedi S, Hassanshahian M. Antifungal Effects of the Extract of the Withania Somnifera on Candida Albicans. Advance Herbal Medicine. 2016; 2(1):32-43.
20. Hamayeli H, Shoshtari A, Hassanshahian M, Askari M. Study the Antimicrobial Activity of Six Marine Sponges and Three Parts of Sea Anemone on Candida Albicans. Journal Coastal Life Medicine. 2016; 4(8):122-9. [DOI:10.12980/jclm.4.2016J6-76]
21. Mashhadi M, Fakhri J, Saeedi S, Hassanshahian M, Abkhoo A. Antimicrobial Effects of Medicinal Plants Collected in Zabol, Iran, on Pathogenic Food Pathogenic. Journal of Medical Bacteriology. 2016; 5(3):18-28.
22. Jahani Z, Hosseinzadeh F, Shahi Z, Shikhzadeh M, Hassanshahian M, Saeedi S. In Vitro Study of Antimicrobial Effects of Rosmarinus Officinalis and Glycyrrhiza Glabra Extracts Against Some Pathogens. Advance Herbal Medicine. 2016; 2(4):32-9.
23. Heydari F, Saeedi S, Hassanshahian M. Antibacterial Activity of Mentha Longifolia Against Salmonella Typhimurium. Advance Herbal Medicine. 2015; 1(3):42-7.
24. Mohsenipour Z, Hassanshahian M. Investigating the Effectiveness of Centaureacyanus Extracts on Planktonic Growth and Biofilm Structures of Six Pathogenic Bacteria. SSU Journals. 2014; 22(4):1358-70.
25. Mohsenipour Z, Hassanshahian M. Inhibitory Effects of Tamarix Hispida Extracts on Planktonic Form and Biofilm Formation of Six Pathogenic Bacteria. Biological Journal Microbiology. 2015; 4(13):25-36.
26. Sepehri Z, Hassanshahian M, Shahi Z, Nasiri A, Baigi S. Antibacterial Effect of Ethanol Extract of Camellia Sinensis L Against Escherichia Coli. Asian Pacific Journal Microbiology Research. 2014; 2(1):6-8.
27. Rezaie Keikhaie K, Bagheri G, Hassanshahian M, Saeidi S. Antimicrobial Effects of Zataria Multiflora Essential Oils on Acinetobacter Strains Isolated From

www.SID.ir

Archive of SID

Clinical Specimens. Journal Herbal Drug. 2018; 8(4):251-6. [DOI:10.14196/JHD.2018.251]

28. Jabra Rizk MA, Meiller TF, James CE, Shirtliff ME. Effect of Farnesol on Staphylococcus Aureus Biofilm Formation and Antimicrobial Susceptibility. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2006; 50(4):1463-9. [DOI:10.1128/AAC.50.4.1463-1469.2006] [PMID] [PMCID]
29. Sandasi M. The Effect of Plant Extraction on Microbial Biofilm Formation and Development [Master thesis]. Pretoria: Tshwane University of Technology; 2008.
30. Ramage G, López-Rib JL. Techniques for Antifungal Susceptibility Testing of Candida Albicans Biofilms. In: Ernest EJ, Rogers PD, editors. Antifungal Agents. Totowa, New Jersey: Humana Press; 2005.
31. Høiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic Resistance of Bacterial Biofilms. International Journal of Antimicrobial Agents. 2010; 35(4):322-32. [DOI:10.1016/j.ijantimicag.2009.12.011] [PMID]
32. Stanisavljević I, Stojičević S, Veličković D, Veljković V, Lazić M. Antioxidant and Antimicrobial Activities of Echinacea (Echinacea Purpurea L.) Extracts Obtained by Classical and Ultrasound Extraction. Chinese Journal of Chemical Engineering. 2009; 17(3):478-83. [DOI:10.1016/S1004-9541(08)60234-7]
33. Hoiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic Resistance of Bacterial Biofilms. International Journal of Antimicrobial Agents. 2010; 35:322-32. [DOI:10.1016/j.ijantimicag.2009.12.011] [PMID]
34. Ghotaslou R, Salahi B. Effects of Oxygen on In-Vitro Biofilm Formation and Antimicrobial Resistance of Pseudomonas Aeruginosae. Pharmaceutical Sciences. 2013; 19(3):96.
35. Nascimento GG, Locatelli J, Freitas PC, Silva GL. Antibacterial Activity of Plant Extracts and Phytochemicals on Antibiotic-Resistant Bacteria. Brazilian Journal of Microbiology. 2000; 31(4):247-56. [DOI:10.1590/S1517-83822000000400003]
36. Cui Y, Oh YJ, Lim J, Youn M, Lee I, Pak HK, et al. AFM Study of the Differential Inhibitory Effects of the Green Tea Polyphenol Epigallocatechin-3-Gallate (Egcg) Against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. Food Microbiology. 2012; 29(1):80-7. [DOI:10.1016/j.fm.2011.08.019] [PMID]
37. Radji M, Agustama RA, Elya B, Tjampakasari CR. Antimicrobial Activity of Green Tea Extract Against Isolates of Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus and Multi-Drug Resistant Pseudomonas Aeruginosa. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 2013; 3(8):663-7. [DOI:10.1016/S2221-1691(13)60133-1]
38. Liaqat I, Pervaiz Q, Bukhsh SJ, Ahmed SI, Jahan N. Investigation of Bactericidal Effects of Medicinal Plant Extracts on Clinical Isolates and Monitoring Their Biofilm Forming Potential. Pakistan Veterinary Journal. 2016; 36(2):159-64.
39. Darabpour E, Motamedi H, Nejad SM. Antimicrobial Properties of Teucrium Polium Against Some Clinical Pathogens. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. 2010; 3(2):124-7. [DOI:10.1016/S1995-7645(10)60050-8]
40. Hatano T, Kusuda M, Inada K, Ogawa TO, Shiota S, Tsuchiya T, et al. Effects of Tannins and Related Polyphenols on Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus. Phytochemistry. 2005; 66(17):2047-55. [DOI:10.1016/j.phytochem.2005.01.013] [PMID]
41. Karsha PV, Lakshmi OB. Antibacterial Activity of Black Pepper (Piper Nigrum Linn.) With Special Reference to Its Mode of Action on Bacteria. Indian Journal of Natural Products and Resources. 2010; 1(2):213-15.
42. Sabbagh SK, Saeedi S, Dehbashi Z, Naeeini MM. Antimicrobial Activity of Ethanolic Extract of Black Pepper (Piper Nigrum) and March (Peganum Harmala) Against Antibiotic-resistant of Staphylococcus Aureus Strains. Bimonthly Journal of Sabzevar University of Medical Sciences. 2014; 22(5).
43. Erasto P, Bojase MoletaG, Majinda RRT. Antimicrobial and Antioxidant Flavonoids From the Roots Wood of Bolusathusspesiosus. Phytochem. 2004; 65:875-80. [DOI:10.1016/j.phytochem.2004.02.011] [PMID]
44. Viljoen A, Van Vuuren S, Ernst E, Klepser M, Demirci B, Başer H, et al. Osmitopsis Asteriscoides (Asteraceae)-the Antimicrobial Activity and Essential Oil Composition of A Cape-Dutch Remedy. Journal of Ethnopharmacology. 2003; 88(2):137-43. [DOI:10.1016/S0378-8741(03)00191-0]
45. Kali A. Antibiotics and Bioactive Natural Products in Treatment of Methicillin Resistant Staphylococcus Aureus: A Brief Review. Pharmacognosy Reviews. 2015; 9(17):29. [DOI:10.4103/0973-7847.156329] [PMID] [PMCID]
46. Thakur P, Chawla R, Chakotiya AS, Tanwar A, Goel R, Narula A, et al. Camellia Sinensis Ameliorates the Efficacy of Last Line Antibiotics Against Carbapenem Resistant Escherichia Coli. Phytotherapy Research. 2016; 30(2):314-22. [DOI:10.1002/ptr.5535] [PMID]
47. Farooqui A, Khan A, Borghetto I, Kazmi SU, Rubino S, Paglietti B. Synergistic Antimicrobial Activity of Camellia Sinensis and Juglans Regia Against Multidrug-Resistant Bacteria. PloS One. 2015; 10(2):e0118431.

www.SID.ir

Archive of SID

[DOI:10.1371/journal.pone.0118431] [PMID] [PMCID]

48. Agrawal I. Susceptibility of Bacterial Biofilms Against Some Leaf Extracts. Plant Sciences Feed. 2011; 1(5):69-73.

49. Gibbons S. Anti-Staphylococcal Plant Natural Products. Natural Product Reports. 2004; 21(2):263-77. [DOI:10.1039/b212695h] [PMID]

50. 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. [DOI:10.1039/b821648g] [PMID]

www.SID.ir