



Research Article

Investigating the synergic effects of the extracts of *Camellia sinensis*, *Rosmarinus officinalis*, and *Thymus vulgaris* with ampicillin against resistant *Pseudomonas aeruginosa* species

Pouria Meidany¹, Seyedeh Hoda Alavizadeh^{2,3}, Hamid Reza Rahimi⁴, Firoozeh Soleymani¹, Fatemeh Gheybi^{1,3*}, Amin Jalili^{1*}

¹Department of Nanotechnology and Medical Biotechnology, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

²Department of Pharmaceutical Nanotechnology, Faculty of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

³Nanotechnology Research Center, Pharmaceutical Technology Institute, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

⁴Department of Medical Genetics and Molecular Medicine, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

***Corresponding author:** Fatemeh Gheybi, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran. E-mail: gheybif@mums.ac.ir; Amin Jalili, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran. E-mail: jalila@mums.ac.ir.

DOI: [10.32592/nkums.16.1.87](https://doi.org/10.32592/nkums.16.1.87)

How to Cite this Article:

Meidany P, Alavizadeh S H, Rahimi H R, Soleymani F, Gheybi F, Jalili A. Investigating the synergic effects of the extracts of *Camellia sinensis*, *Rosmarinus officinalis*, and *Thymus vulgaris* with ampicillin against resistant *Pseudomonas aeruginosa* species. J North Khorasan Univ Med Sci. 2024;16(1):87-96. DOI: 10.32592/nkums.16.1.87

Received: 04 Nov 2023

Accepted: 09 Mar 2024

Keywords:

Biofilms

Camellia sinensis extract

Pseudomonas aeruginosa

Rosmarinus officinalis oil

Thymus vulgaris extract

Abstract

Introduction: The most common bacterium linked to the hospital and pneumonia-related infections is *Pseudomonas aeruginosa*, a known opportunistic pathogen. High mortality rates are brought on by this bacterium in hospitalized patients, immunocompromised individuals, and cystic fibrosis patients. The formation of biofilm structures has also made it more challenging to treat patients. Due to the severe side effects of the antibiotics, the lack of efficacy due to resistance, and the well-documented antibacterial effects of traditional plants, this study investigated the antibacterial properties of the combination of thyme, rosemary, and green tea. Therefore, the main purpose of the current study was to examine the antibacterial and anti-biofilm effects of the extracts of these three plants.

Method: *Pseudomonas aeruginosa* strains were obtained from patients at Ghaem Hospital, Mashhad, Iran. The efficacy of various antibiotics on different strains was studied, and bacterial strains were classified into sensitive, semi-sensitive, and resistant. The minimum inhibitory concentration (MIC) of the combination of the three extracts, as well as the antibiotic of choice, was determined. The effect of the extract on the biofilm formation was also investigated.

Results: The results indicated that the ternary composition has significant antibacterial and anti-biofilm effects; also, the combination of these three extracts has shown significant synergistic properties with each other. Further, the extracts inhibited the formation and growth of the biofilm.

Conclusion: Results of this study indicated that the optimum combination of the three extracts possessed a remarkable antibacterial and anti-biofilm activity. Further, we have shown the synergistic antibacterial activity of the three extracts improved in the presence of the antibiotic of choice, resulting in a decrease in the MIC value of the antibiotic.



بررسی اثرهای سینرژیک عصاره گیاهان چای سبز، رزماری و آویشن در ترکیب با آمپی سیلین علیه سویه‌های مقاوم سودوموناس آئروژینوزا

پوریا میدانی^۱ ID، سیده هدا علوی‌زاده^{۲،۳} ID، حمیدرضا رحیمی^۴ ID، فیروزه سلیمانی^۱ ID، فاطمه غیبی^{۱،۳} ID*، امین جلیلی^۱ ID*

^۱گروه نانوفناوری و زیست‌فناوری پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
^۲گروه نانوفناوری دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
^۳مرکز تحقیقات نانوفناوری دارویی، مؤسسه فناوری‌های دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
^۴گروه ژنتیک و پزشکی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

*نویسنده مسئول: فاطمه غیبی، مشهد، میدان آزادی، پردیس دانشگاه، دانشکده پزشکی. ایمیل: gheybif@mums.ac.ir؛ امین جلیلی، مشهد، میدان آزادی، پردیس دانشگاه، دانشکده پزشکی. ایمیل: jalila@mums.ac.ir.

DOI: 10.32592/nkums.16.1.87

<p>چکیده</p> <p>مقدمه: سودوموناس آئروژینوزا پاتوژنی فرصت‌طلب و متداول‌ترین باکتری مرتبط با عفونت‌های بیمارستانی و ذات‌الریه است. با توجه به عوارض جانبی آنتی‌بیوتیک‌ها، کاهش کارایی به‌علت مقاومت دارویی و اثبات اثرهای آنتی‌باکتریال ترکیبات گیاهی، در این طرح خصوصیات آنتی‌باکتریایی سه عصاره آویشن، رزماری و چای سبز بررسی شد.</p> <p>روش کار: ابتدا جداسازی سویه‌های کلینیکی انجام شد و سپس، سویه‌ها ذخیره شدند. مقاومت سویه‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها اندازه‌گیری شد و سویه‌ها به سه دسته مقاوم، حساس و نیمه‌حساس تقسیم شدند. حداقل غلظت مهارکننده رشد باکتری (MIC) توسط ترکیب سه عصاره تعیین شد. حداقل غلظت مهارکننده رشد مؤثر آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین نیز تعیین شد. در نهایت، اثر متقابل ترکیب عصاره‌ها با آنتی‌بیوتیک انتخابی بررسی شد. همچنین، اثر عصاره‌ها بر تشکیل بیوفیلم سودوموناس آئروژینوزا بررسی شد.</p> <p>یافته‌ها: سه عصاره آویشن، رزماری و چای سبز مانع رشد زیرگونه‌های متفاوتی از باکتری شدند. ترکیب بهینه از سه عصاره باعث کاهش MIC عصاره‌ها به‌تنهایی شد. عصاره‌ها و آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین بر یکدیگر خاصیت هم‌افزایی نشان دادند و ترکیب عصاره‌ها مانع از رشد بیوفیلم شد.</p> <p>نتیجه‌گیری: نتایج حاکی از آن است که ترکیب سه عصاره اثرهای ضدباکتریایی و بیوفیلمی شایان ذکر دارند. همچنین، ترکیب این سه عصاره با هم و در ترکیب با آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین خاصیت سینرژیک دارد.</p>	<p>تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۸/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۲/۱۹</p> <p>واژگان کلیدی: بیوفیلم عصاره آویشن روغن رزماری عصاره چای سبز سودوموناس آئروژینوزا</p>
--	--

مقدمه

آئروژینوزای مقاوم به چنددارو در واحدهای سوختگی، به ایجاد رویکردهای جدید برای مقابله با این باکتری بسیار توجه شده است [۴]. بیماری‌زایی این پاتوژن چندعاملی است و به فاکتورهای متعدد داخل و خارج سلول، از جمله عوامل دخیل در چسبندگی، جذب آهن، آگزوانزیم‌ها و آگزوتوکسین‌ها نسبت داده شده است [۵-۷]. در کنار نفوذپذیری پایین غشای خارجی باکتری، پمپ‌های افلاکس غشای باکتری نقش مهمی در دفع ترکیبات سمی و همچنین، بیرون راندن آنتی‌بیوتیک‌ها از باکتری دارند [۸]. به‌طور خاص، نشان داده شده است که پروتئین‌های متعلق به خانواده RND در بروز مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سودوموناس آئروژینوزا نقش ایفا می‌کنند [۹]. به‌علاوه، ترشح آنزیم‌های غیرفعال‌کننده آنتی‌بیوتیک‌ها مانند β -لاکتامازها و

مقاومت آنتی‌بیوتیکی در پاتوژن‌های باکتریایی از چالش‌های مهم در حوزه درمان است که با افزایش درخور توجه در میزان مرگ‌ومیر بیماران نیز همراه است. بروز الگوی مقاومت چنددارویی (MDR) در میکروارگانیسم‌های گرم مثبت و منفی نه‌تنها درمان را با مشکل مواجه می‌سازد، بلکه ممکن است باعث بروز عفونت‌های درمان‌ناپذیر نیز شود [۱]. از این‌رو، سازمان جهانی بهداشت مقاومت آنتی‌بیوتیکی را یکی از سه تهدید مهم بهداشت عمومی در قرن ۲۱ معرفی کرده است [۲].

باکتری سودوموناس آئروژینوزا نوعی باکتری گرم منفی فرصت‌طلب و از باکتری‌های متداول مرتبط با عفونت‌های بیمارستانی است [۳]. همچنین، پیرو گزارش‌های مکرر از عفونت‌های ناشی از سودوموناس

آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین ۲۵۰ mg به صورت تجاری (شرکت دانا دارو-ampivil®) تهیه شد.

سویه‌های باکتریایی

نه سویه کلینیکی متفاوت سودوموناس آئروژینوزا که از بیماران بیمارستان قائم (مشهد) جدا شده بودند، بررسی و تأیید شدند. این نه سویه، جداگانه، به میزان ۲ میکرولیتر ($10^7 \times 1/5$) به ۵ میلی‌لیتر محیط کشت LB Broth القا شدند. پس از یک روز انکوباسیون با استفاده از لوب استاندارد استریل به میزان ۱ میکرولیتر به محیط کشت Broth Agar القا شد و کشت افتراقی برای تهیه تک‌کلنی انجام گرفت. پلیت برای مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد (Memmert INB500, Germany) انکوبه شد. تک‌کلنی به دست آمده به محیط کشت مایع تازه انتقال یافت و برای ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا در مراحل بعدی، از آن استفاده شود. برای ذخیره‌سازی باکتری‌ها، گلیسرول (۳ میلی‌لیتر) تمام‌خالص (۱۰۰ درصد) با ۳ میلی‌لیتر آب مقطر استریل رقیق شد و از فیلتر سرسرنگی با سایز منافذ ۰/۲ میکرومتر عبور داده شد. در انتها، ۵۰۰ میکرولیتر از محیط مایعی که کلنی سویه مدنظر به آن القا شده بود، همراه با ۵۰۰ میکرولیتر گلیسرول استریل شده وارد کرایوپوئال شد و در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفت.

بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی

تست حساسیت ضدباکتریایی این سویه‌ها با استفاده از روش انتشار دیسک کربی-بائر (Bauer-Kirby disk diffusion method) انجام و نتایج بر اساس دستورالعمل‌های مؤسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی ۲۰۲۱ (CLSI) تفسیر شد. این تست که تحت عنوان تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی انتشار دیسک نیز شناخته می‌شود، یک روش سنجش میکروبیولوژیکی مبتنی بر کشت است که در آزمایشگاه‌های تشخیصی و کشف دارو به کار می‌رود. در این روش، کشت خالص باکتری در نرمال سالین ۰/۹ درصد معلق می‌شود، کدورت آن استاندارد می‌شود و به‌طور یکنواخت، روی صفحه محیط جامد مناسب (مانند مولر هینتون آگار) قرار می‌گیرد. سپس، یک دیسک کاغذ صافی آغشته به آنتی‌بیوتیک یا عصاره روی سطح آگار قرار می‌گیرد. مواد تشکیل‌دهنده دیسک از کاغذ صافی به داخل آگار پخش می‌شود. اگر آنتی‌بیوتیک یا عصاره در غلظت معینی در برابر باکتری‌ها مؤثر باشد، هیچ کلنی در جایی که غلظت در آگار بیشتر یا مساوی غلظت مؤثر باشد، رشد نخواهد کرد؛ این ناحیه منطقه مهار نامیده می‌شود [۲۵].

دیسک‌ها حاوی آمپی‌سیلین (۱۰ میکروگرم)، لووفلوکساسین (۵ میکروگرم)، سفترایم (۳۰ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، مروپنم (۱۰ میکروگرم) و کاربنسیلین (۳۰ میکروگرم) بودند. قطر هاله ایجادشده توسط آنتی‌بیوتیک‌ها به وسیله کولیس اندازه‌گیری شد. قطر نواحی بازدارندگی با مقادیر بحرانی هر دیسک ضد میکروبی طبق جدول ۱ مقایسه شد تا باکتری هدف به عنوان حساس، مقاوم یا نیمه‌حساس تعیین شود.

آنزیم‌های اصلاح‌کننده آمینوگلیکوزیدها [۱۱، ۱۰] یکی دیگر از مکانیسم‌های بروز مقاومت ذاتی است که می‌تواند پیوندهای شیمیایی ساختار آنتی‌بیوتیک‌ها مانند آمیدها و استرها حساس به هیدرولیز را تخریب کند [۱۲]. مقاومت تطبیقی توانایی یک باکتری را برای زنده ماندن در برابر آنتی‌بیوتیک به دلیل تغییرات موقت در بیان ژن و/یا پروتئین در پاسخ به محرک محیطی افزایش می‌دهد [۱۳]. در سودوموناس آئروژینوزا، بهترین مکانیسم مقاومت انطباقی تشکیل بیوفیلم است که به عفونت مداوم و پیش‌آگهی ضعیف در بیماران سیستمیک فیبروزیس منجر می‌شود [۱۴]. اثر عمده دیگر تشکیل فنوتیپی از باکتری‌ها تحت عنوان Persister است که غلظت‌های بالای آنتی‌بیوتیک را تحمل می‌کند [۱۵]. تشکیل Persisters و بیوفیلم و ارتباط این دو پدیده در شرایط آزمایشگاهی و نیز در داخل بدن، درمان عفونت‌های ناشی از سودوموناس آئروژینوزا را در بیماران مختلف، از جمله بیماران مبتلا به سیستمیک فیبروزیس، پیچیده‌تر کرده است [۱۶].

با ظهور باکتری‌های مقاوم به درمان، روش‌های جایگزینی برای کنترل آن‌ها مطالعه شده است: باکتریوسین‌ها از دهه ۱۹۶۰، آنتی‌بادی‌ها و باکتریوفاژها از دهه ۱۹۷۰ و روغن‌های اساسی از ۱۹۹۰ برای کنترل عوامل بیماری‌زای MDR مطالعه شده‌اند [۱۷].

علاوه بر این، تحقیقات متعددی بر کاربرد نانوحامل‌ها متمرکز شده است [۱۸، ۱۹]. یکی از رویکردهایی که به‌طور مکرر برای کنترل عوامل بیماری‌زای MDR به بحث گذاشته شده است، کاربرد اسانس‌های استخراج‌شده از گیاهان دارویی است [۲۰].

اسانس‌های گیاهی مایعاتی فرار، طبیعی و معطر تعریف می‌شوند که از قسمت‌های مختلف گیاهان، به‌ویژه برگ‌ها و گل ترشح می‌شوند و از گیاهان در برابر میکروب‌ها محافظت می‌کنند [۲۱]. این ترکیبات فعالیت ضد میکروبی درخور توجهی را علیه بسیاری از سویه‌های مقاوم نشان داده‌اند و به‌طور گسترده‌ای، برای درمان طیف وسیعی از عفونت‌های باکتریایی به کار رفته‌اند [۲۲، ۲۳]. بسیاری از مطالعات نیز اثرهای مفید ترکیبی از اسانس‌های گیاهی را به‌تنهایی یا در تجویز با آنتی‌بیوتیک‌های تجاری نشان داده‌اند [۲۴].

با توجه به مطالعات قبلی و اثبات اثرهای ضدباکتریایی و ضدبیوفیلمی برخی از اسانس‌های گیاهی پرکاربرد بر باکتری، در این طرح اثرهای ضدباکتریایی عصاره آویشن، رزماری و چای سبز به‌تنهایی، به صورت ترکیبی و نیز در کنار یک آنتی‌بیوتیک وسیع‌الطیف از گروه β -لاکتام‌ها بررسی شد. همچنین، اثر مهار ترکیب بهینه‌شده از سه عصاره بر رشد بیوفیلم ناشی از سودوموناس آئروژینوزا مطالعه شد.

روش کار

مواد: تمام مواد مورد استفاده در این مقاله از شرکت سیگما تهیه شده است، به‌جز موادی که در مقابل آن‌ها ذکر شده است. محیط کشت‌های LB Broth و Broth Agar از شرکت Sibresco تهیه شدند. ویال‌های

جدول ۱. مقادیر بحرانی هر آنتی‌بیوتیک در برابر سودوموناس آئروژینوزا مطابق با استانداردهای CLSI 2021. بعد از اندازه‌گیری قطر ممانعت‌کنندگی، نتایج با این جدول مقایسه شد و نوع مقاومت سویه‌ها مشخص شد.

نوع آنتی‌بیوتیک	میزان قطر هاله عدم رشد برای سودوموناس آئروژینوزا بر حسب میلی‌متر	مقاوم	نیمه‌حساس	حساس
(10µg) Ampiciline (AM)	≥ ۱۴	۱۵-۲۰	≥ ۲۱	
(5µg) Levofloxacin (LEV)	≥ ۱۵	۱۶-۲۱	≥ ۲۲	
(30µg) Ceftazidime (CAZ)	≥ ۱۴	۱۵-۱۷	۱۸≥	
(10µg) Gentamicin (GM)	≥ ۱۲	۱۳-۱۴	۱۵≥	
(10µg) Meropenem (MEN)	۱۵≥	۱۴-۱۸	≥ ۱۹	
(30µg) Carbenicillin (CB)	≥ ۱۴	۱۵-۲۰	≥ ۲۱	

تهیه عصاره

عصاره‌های آبی-الکلی گیاهان در دانشکده داروسازی مشهد تهیه و به غلظت ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در DMSO رسانده شد. تهیه استاندارد نیم مک فارلند: استانداردهای مک فارلند به‌عنوان مرجعی برای تنظیم کدورت سوسپانسیون‌های باکتریایی استفاده می‌شوند تا تعداد باکتری‌ها در محدوده معینی قرار گیرد. استاندارد نیم مک فارلند با مخلوط کردن ۰/۵ میلی‌لیتر از باریم کلرید دی‌هیدرات ۱۷۵/۱ درصد با ۹۵/۹ میلی‌لیتر اسید سولفوریک تهیه شد. میزان جذب در طول موج ۶۰۰ نانومتر برابر با ۰/۹ تعیین شد.

تعیین حداقل غلظت متوقف‌کننده رشد (Minimum Inhibitory Concentration)

برای به دست آوردن حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی (MIC) از روش Agar dilution استفاده شد. در این روش، پس از تهیه محیط کشت LB agar و قرار دادن آن در اتوکلاو، دمای محیط کشت به ۵۰ درجه سانتی‌گراد رسانده شد. سپس، ۲۰ میلی‌لیتر از محیط کشت به یک فالكون استریل ۵۰ میلی‌لیتر انتقال داده شد. پس از آن، غلظت مدنظر از هریک از عصاره‌ها به‌تنهایی و در ترکیب با یکدیگر اضافه شد و در نهایت، محیط کشت به پلیت استریل انتقال داده شد تا به فرم جامد خود برسد. سپس، میزان تعیین‌شده باکتری (بر اساس استاندارد نیم مک فارلند) روی محیط کشت، به‌صورت چمنی، کشت داده شد و نتایج پس از ۲۴ ساعت بررسی شد.

بررسی تأثیر دی‌متیل سولفواکساید (DMSO) در اثرهای

ضدباکتریایی عصاره‌ها

حلال‌های مختلفی نظیر اتانول، متانول و DMSO برای تهیه عصاره‌های چای سبز، آویشن و رزماری بررسی شدند. در پایان، از DMSO به‌دلیل حلالیت مناسب استفاده شد. در نظر گرفتن خصوصیات ضدباکتریایی این حلال، متناسب با غلظت عصاره‌ها از DMSO برای بررسی اثرهای ضدباکتریایی استفاده شد. همچنین، برای جلوگیری از دخالت pH عصاره‌ها از بافر فسفات با pH=7 استفاده شد.

تهیه محلول آنتی‌بیوتیکی و بررسی درمان ترکیبی

دو سویه نیمه‌مقاوم وارد مطالعه شدند. مطابق توضیحات داده‌شده در قسمت روش کار، MIC آنتی‌بیوتیک وسیع‌الطیف انتخابی (آمیسیلین) تعیین شد. ابتدا پودر آنتی‌بیوتیک در ۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر استریل

حل شد. غلظت به‌دست‌آمده رقیق شد و MIC آنتی‌بیوتیک تعیین شد. پس از آن، برای بررسی اثر درمان ترکیبی، از روش Agar dilution استفاده شد. پس از رسیدن دمای آگار به ۵۰ درجه سانتی‌گراد، غلظت‌های سریالی از آنتی‌بیوتیک (MIC ۱/۴، MIC ۱/۲ و MIC ۱) به همراه غلظت بهینه‌شده از ترکیب عصاره‌ها به محیط کشت اضافه شد. سپس، سویه‌های مدنظر (۲ و ۷ به‌عنوان دو سویه نیمه‌مقاوم) با تعداد مشخصی باکتری از سوسپانسیون باکتریایی (معادل نیم مک فارلند) بر محیط کشت، کشت داده شدند. محیط کشت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۲۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد و نتایج ثبت شدند.

برای تعیین نوع برهم‌کنش کمی بین عصاره‌های گیاهی و آنتی‌بیوتیک در برابر باکتری، از شاخص غلظت‌مهارى کسرى (FIC) استفاده شد. شاخص FIC از فرمول زیر محاسبه شد. نوع برهم‌کنش دو ماده ضدباکتریایی تعیین شد [۲۶]. بر اساس شاخص FIC، نوع اثر آنتی‌بیوتیک و ترکیب عصاره‌ها به سه دسته سینرژیسم (۰/۵ <)، هم‌افزایی (۰/۵-۴) و آنتاگونیسم (۴ >) تقسیم شد.

آنتی‌بیوتیک MIC آنتی‌بیوتیک در ترکیب = FIC آنتی‌بیوتیک

MIC به‌تنهایی /

MIC عصاره به‌تنهایی / MIC ترکیب عصاره‌ها = FIC عصاره‌ها

FIC عصاره + FIC آنتی‌بیوتیک = FIC شاخص

تشکیل بیوفیلم توسط باکتری‌ها

تشکیل بیوفیلم توسط سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا با استفاده از روش Microtiter plate (dish) assay انجام شد. مراحل تشکیل بیوفیلم شامل رشد، رنگ‌آمیزی و شمارش بیوفیلم بود. سویه‌ها در تریپتیکاز سویا برات (Sibresco) رشد داده شدند. تحریک تشکیل بیوفیلم توسط سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا با استفاده از پلیت کشت سلولی ۹۶‌چاهکی تعیین شد. سپس، کشت ۲۴‌ساعته، به نسبت ۱:۱۰۰ در TSB حاوی ۲ درصد (w/v) گلوکز رقیق شد. مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی به یک صفحه میکروتیتیر ۹۶‌چاهکی منتقل شد. هر سه سویه در سه تکرار آزمایش شدند. چاهک‌هایی که فقط حاوی TSB استریل بودند، به‌عنوان کنترل عمل کردند. در مرحله رنگ‌آمیزی پس از انکوباسیون ۲۴‌ساعته در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد، با برگرداندن پلیت، محیط کشت دور ریخته شد. سپس، پلیت دو بار با بافر فسفات سالین (pH=۷/۴) شسته شد تا سلول‌های باکتریایی

برای تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی و یافتن آنتی‌بیوتیک مناسب، تست کربی-باثر انجام شد. اگر آنتی‌بیوتیک در غلظت معینی در برابر باکتری‌ها مؤثر باشد، هیچ کلنی باکتریایی در جایی که غلظت در آگار بیشتر یا مساوی غلظت مؤثر باشد، رشد نخواهد کرد؛ این ناحیه منطقه مهار نامیده می‌شود. در این تست قطر نواحی بازدارندگی با مقادیر بحرانی هر دیسک ضد میکروبی مقایسه شد تا باکتری هدف به‌عنوان حساس، مقاوم یا نیمه‌حساس تعیین شود. منطقه مهار شش دیسک آنتی‌بیوتیکی استاندارد تعیین شد. چنان‌که پیشتر ذکر شد، قطر نواحی بازدارندگی با مقادیر بحرانی هر دیسک ضد میکروبی طبق جدول ۱ مقایسه شد تا باکتری هدف به‌عنوان حساس، مقاوم یا نیمه‌حساس تعیین شود. سپس، با توجه به نتایج تست آنتی‌بیوگرام، دو زیرگونه ۲ و ۷ دو سویه نیمه‌حساس و زیرگونه ۱ یک سویه مقاوم در برابر آنتی‌بیوتیک برای ادامه مطالعه در نظر گرفته شدند (جدول ۲).

بررسی عدم اثر DMSO در خاصیت ضدباکتریایی عصاره‌ها

با توجه به اثرهای ضدباکتریایی ذکر شده برای DMSO در برخی مقالات [۲۸-۳۰]، برای بررسی عدم تداخل، غلظتی معادل غلظت DMSO عصاره‌ها به محیط کشت حاوی سویه‌های منتخب باکتری اضافه شد. نتایج حاکی از آن بود که حلال در غلظت مذکور خاصیت ضدباکتریایی ندارد. تعداد کلنی در هر سه سویه بیشتر از ۳۰۰ گزارش شد.

بررسی اثرهای آنتی‌باکتریال عصاره‌های گیاهی

برای تعیین MIC عصاره‌های گیاهی در این مطالعه، به‌دلیل رنگی بودن و کدورت عصاره‌ها و همچنین، عدم حلالیت مناسب عصاره‌ها در محیط آگار، از روش استاندارد Agar dilution استفاده شد. دامنه غلظت عصاره مورد استفاده در این مطالعه در محدوده ۰/۱ تا ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در نظر گرفته شد. نتایج حداقل غلظت متوقف‌کننده رشد هر عصاره به‌تنهایی و ترکیب عصاره‌ها در جدول ۳ گزارش شده است. نسبت غلظت‌های متفاوتی از MIC برای یافتن ترکیب بهینه سه عصاره استفاده شد. در انتها، مؤثرترین غلظت عصاره‌ها حاوی ۰/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر چای سبز با ۰/۰۷۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آویشن و رزماری بود. در این غلظت، دو سویه نیمه‌مقاوم رشد نکردند و سویه مقاوم رشد کمتر و سخت‌تری نشان داد.

غیرچسبیده حذف و جدا شوند. سپس، صفحه به‌صورت معکوس بر یک گاز استریل قرار داده شد. سلول‌های باکتریایی چسبیده با اتانول ۹۵ درصد تثبیت شدند و با ۱۰۰ میکرولیتر کریستال ویوله ۰/۱ درصد به مدت ۵ دقیقه رنگ‌آمیزی شدند. پلیت سه مرتبه به‌منظور حذف رنگ اضافی شسته شد. سپس، به‌آرامی به‌صورت معکوس، بر یک دستمال حوله‌ای قرار داده شد. در مرحله شمارش بیوفیلم پلیت مدنظر خشک شد و بیوفیلم متصل به جداره پلیت مشاهده شد. سپس، ۱۲۵ میکرولیتر استیک اسید ۳۰ درصد به پلیت‌ها افزوده شد. پلیت‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. سپس، ۱۲۵ میکرولیتر از هر چاهک پلیت به چاهک جدیدی منتقل شد. در نهایت، چگالی نوری (OD) در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد. چاهک بدون القای باکتری به‌عنوان کنترل در نظر گرفته شد. بر اساس ODهای به‌دست‌آمده، سویه‌های باکتریایی به چهار دسته (بیوفیلم) ($ODT \leq ODC$)، ضعیف ($ODT \geq 2 ODC$)، متوسط ($2 ODC \leq ODT \leq 4 ODC$) و قوی ($ODT \geq 4 ODC$) طبقه‌بندی شدند [۲۷].

بررسی اثر مهار ترکیب بهینه از عصاره‌ها بر بیوفیلم

برای بررسی اثر مهار همانند مرحله قبل، از روش Microtiter plate assay (dish) با کمی تغییر استفاده شد. در این تست، ۱۰۰ میکرولیتر از ترکیب بهینه عصاره‌ها به ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی افزوده شد. بقیه مراحل مشابه با روش توضیح‌داده‌شده در مرحله قبل انجام شد. اثر مهار ترکیب عصاره‌ها با فرمول زیر محاسبه شد.

$$\frac{ODC - ODT}{ODC} * 100 = \text{اثر مهار}$$

آنالیز آماری

برای بررسی‌های آماری از نرم‌افزار Graphpad Prism 8.0.2 استفاده شد. برای ارزیابی معنی‌دار بودن تفاوت بین گروه‌ها از آزمون آماری One Way ANOVA استفاده شد. سطح معنادار بودن تفاوت $P < 0/05$ در نظر گرفته شد و در نمودارها برای نشان دادن $P < 0/05$ از *، برای $P < 0/01$ از **، برای $P < 0/001$ از *** و برای $P < 0/0001$ از **** استفاده شده است.

یافته‌ها

تست آنتی‌بیوگرام

جدول ۲. نتایج تست کربی-باثر. تست حساسیت ضدباکتریایی این سویه‌ها با استفاده از روش انتشار دیسک کربی-باثر انجام شد. دو سویه ۲ و ۷ با حساسیت کامل به چهار آنتی‌بیوتیک و مقاومت در برابر یک آنتی‌بیوتیک به‌عنوان دو سویه نیمه‌حساس و سویه ۱ با حساسیت به یک آنتی‌بیوتیک و مقاومت در برابر پنج آنتی‌بیوتیک به‌عنوان سویه مقاوم برای ادامه مطالعه انتخاب شدند.

سویه‌های میکروبی	مقاوم	حساس	نیمه‌حساس
۱	AM/CB/MEN/LEV/CAZ	GM	-
۲	AM	CB/MEN/LEV/CAZ	GM
۳	AM/CB/MEN/LEV	GM/CAZ	-
۴	AM/CB/MEN/CAZ	LEV	GM
۵	AM/CB/LEV/CAZ	GM	MEN
۶	AM/MEN/LEV/CAZ	GM	CB
۷	AM	CB/MEN/LEV/ GM	CAZ
۸	AM/CB/MEN/LEV	GM	CAZ

جدول ۳. تعیین MIC ترکیب بهینه شده عصاره ها و آنتی بیوتیک بر دو سویه نیمه مقاوم. MIC سه عصاره جداگانه و به صورت ترکیب سه تایی برای دو گونه نیمه مقاوم با روش Agar dilution تعیین شد. ابتدا آنتی بیوتیک آمپی سیلین به تنهایی و با غلظت ۳۲۰۰ میکروگرم در میکرولیتر به محیط کشت افزوده شد و سپس، سه سویه مورد مطالعه روی محیط کشت داده شدند. همچنین، ترکیب بهینه شده عصاره ها (۲ mg/mL) چای سبز+ ۰/۰۷۵ mg/mL آویشن و رزماری) به همراه آنتی بیوتیک آمپی سیلین با همان غلظت به محیط کشت افزوده شد. نتایج حاکی از مؤثر بودن ترکیب عصاره ها و آنتی بیوتیک است، به نحوی که استفاده از ترکیب مدنظر باعث کاهش MIC می شود. آزمایش های تعیین MIC به صورت مستقل سه بار تکرار شد.

سویه های میکروبی	MIC عصاره ها					
	چای سبز	رزماری	آویشن	ترکیب هر سه عصاره		
۲	۳/۰ $\frac{mg}{ml}$	۰/۹ $\frac{mg}{ml}$	۰/۹ $\frac{mg}{ml}$	۰/۰۷۵ $\frac{mg}{ml}$ چای سبز+ ۰/۰۷۵ $\frac{mg}{ml}$ آویشن+ ۰/۰۷۵ $\frac{mg}{ml}$ رزماری	۰/۰۷۵ $\frac{mg}{ml}$	۰/۰۷۵ $\frac{mg}{ml}$
۷	۳/۰ $\frac{mg}{ml}$	۹۰/۰ $\frac{mg}{ml}$	۹۰/۰ $\frac{mg}{ml}$	۰/۰۷۵ $\frac{mg}{ml}$ چای سبز+ ۰/۰۷۵ $\frac{mg}{ml}$ آویشن+ ۰/۰۷۵ $\frac{mg}{ml}$ رزماری	۰/۰۷۵ $\frac{mg}{ml}$	۰/۰۷۵ $\frac{mg}{ml}$

بررسی اثرهای ضد میکروبی ترکیب عصاره ها و آنتی بیوتیک

استاندارد

برای بررسی اثر ترکیبی عصاره ها و آنتی بیوتیک با روش Agar dilution، ابتدا حداقل غلظت مؤثر آنتی بیوتیک آمپی سیلین برابر با ۶۴۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تعیین شد. سپس، حداقل غلظت مؤثر آنتی بیوتیک به همراه غلظت ترکیب بهینه شده عصاره ها برابر با ۳۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر حاصل شد. برای بررسی نوع اثر متقابل عصاره ها و آنتی بیوتیک از شاخص FIC استفاده شد. نتایج شاخص FIC حاکی از آن است که دو ترکیب مورد استفاده خاصیت هم افزایی دارند. این شاخص برای ترکیب عصاره ها برابر با ۰/۶ و برای آنتی بیوتیک برابر با ۰/۵ گزارش شد. حاصل جمع شاخص برای ترکیب عصاره ها و آنتی بیوتیک برابر با ۱/۱ گزارش شد.

$$\text{FIC} = 3200 \mu\text{g/mL} / 6400 \mu\text{g/mL} = 0.5$$

$$\text{FIC} = 0.2 \text{ mg/mL} / 0.3 \text{ mg/mL} = 0.6$$

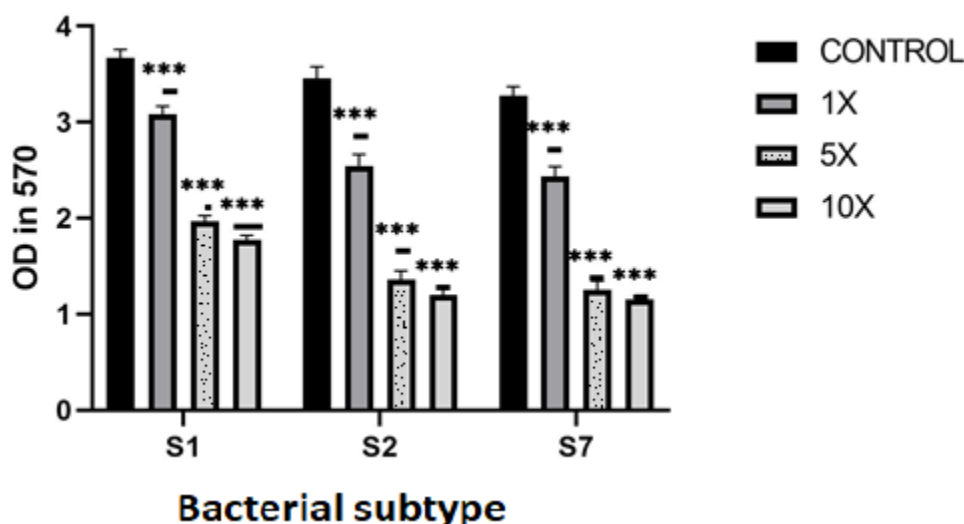
$$\text{FIC} = 0.5 + 0.6 = 1.1$$

تحریک باکتری ها به تشکیل بیوفیلم

در محیط آزمایشگاهی، برای تحریک تولید بیوفیلم توسط باکتری ها از روش assay (dish) Microtiter plate استفاده شد. پس از طی مراحل رشد در پلیت ۹۶ چاهکی و رنگ آمیزی با رنگ کریستال ویوله، مرحله شمارش با استفاده از خوانشگر پلیت انجام شد. از چاهک حاوی محیط کشت بدون افزودن سوسپانسیون باکتریایی به عنوان کنترل منفی استفاده شد. هر آزمایش به صورت مستقل، سه مرتبه تکرار شد. تقسیم بندی انواع بیوفیلم ایجاد شده توسط سویه ها توسط فرمول ذکر شده انجام شد. نتایج OD مطابق با جدول ۴ گزارش شد.

تأثیر ترکیب عصاره ها بر میزان تشکیل بیوفیلم

برای بررسی اثر مهار ترکیب بهینه شده بر ساختار بیوفیلم، روش assay (dish) Microtiter plate با اندکی تغییر به کار رفت. نتایج در جدول ۴ گزارش شده است. طبق نمودار ترسیم شده در شکل ۱ و تحلیل داده ها، عصاره ها خاصیت محدودکنندگی رشد بیوفیلم داشتند. تحلیل های آماری نشان می دهند که خاصیت محدودکنندگی رشد بیوفیلم در غلظت های ۵ برابر و ۱۰ برابر با یکدیگر تفاوت چندانی ندارند.



شکل ۱. اثر مهارکنندگی ترکیب بهینه شده عصاره ها بر رشد بیوفیلم. اثربخشی ترکیب عصاره ها در میزان ۵، ۱۰ و ۱۰۰ برابر حداقل غلظت مؤثر در تصویر نشان داده شده است. هر یک از آزمایش ها به صورت سه تایی مستقل انجام شد. نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش شدند. آنالیز آماری به روش Two way ANOVA انجام شد. نتایج حاکی از مؤثر بودن ترکیب عصاره ها در جلوگیری از تشکیل بیوفیلم است. میزان تفاوت اثر افزایش غلظت ۵ برابری و ۱۰ برابری معنادار نیست. شایان ذکر است که مقاومت سویه ۱ در برابر عصاره ها از بقیه سویه ها بیشتر است ($***P < 0.001$).

جدول ۴. نتایج اثر مهارتی ترکیب بهینه‌شده بر تشکیل بیوفیلم. ابتدا تحریک باکتری به تشکیل بیوفیلم با روش Microtiter plate (dish) assay انجام شد. با توجه به رابطه ذکرشده در قسمت روش انجام کار، سه سویه مدنظر توانایی بالایی در تولید بیوفیلم از خود نشان دادند. شایان ذکر است که سویه ۱ قدرت بیشتری در تشکیل بیوفیلم از خود نشان داد. چنان‌که قبلاً ذکر شد، بر اساس ODهای به‌دست‌آمده، سویه‌های باکتریایی در دسته قوی ($OD \geq 4$) طبقه‌بندی شدند. در مرحله بعد، بررسی اثر مهارتی ترکیب عصاره‌ها با غلظت‌های تعیین‌شده در سه مرحله جداگانه همراه با کنترل مثبت (بیوفیلم تیمارشده با محیط کشت TSB تازه به‌جای ترکیب عصاره‌ها) و کنترل منفی (چاهک حاوی محیط کشت به‌تنهایی) انجام شد. نتایج به‌صورت میانگین \pm انحراف معیار در جدول گزارش شدند. درصد ممانعت از رشد با فرمول $\% \text{اثر مهارتی} = \frac{\text{تست OD} - \text{کنترل OD}}{\text{کنترل OD}} * 100$ محاسبه شد. آنالیز آماری به روش Two way ANOVA انجام شد.

سویه‌های میکروبی	OD کنترل منفی	OD تشکیل‌شده	نوع بیوفیلم
۱	۰/۸۹۷	۳/۶۱۴	قوی
۲	۰/۸۱۲	۳/۳۹۴	قوی
۷	۰/۷۹۶	۳/۳۷۸	قوی
	درصد ممانعت غلظت بهینه	درصد ممانعت غلظت ۵ برابر بهینه	درصد ممانعت غلظت ۱۰ برابر بهینه
۱	۱۶/۰۴	۴۶/۴۳	۵۰/۳۷
۲	۲۶/۳۴	۶۰/۵۹	۶۵/۳۴
۷	۲۵/۵۹	۶۱/۷۵	۶۴/۷۵

بحث

عفونت‌های ناشی از باکتری‌های مقاوم به چنددارو با سرعت چشمگیری در حال افزایش است. در میان سویه‌های گرم منفی، *اشریشیا کلی*، *کلبسیلا پنومونیه*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *اسینتوباکتر بومانی* گونه‌های شایع‌تر مقاوم به چنددارو شناخته شده‌اند [۳۱]. *سودوموناس آئروژینوزا* یک باکتری گرم منفی است که باعث ایجاد عفونت‌های بیمارستانی کشنده در افراد دارای نقص ایمنی، مانند بیماران مبتلا به سرطان، بیماران مبتلا به سیستمیک فیبروزیس، سوختگی‌های شدید یا آلوده به ویروس نقص ایمنی انسانی می‌شود [۳۲]. درمان بیماری‌های باکتریایی با استفاده از عصاره‌های گیاهی یکی از راه‌های درمانی جدید است. در این پژوهش، سه عصاره چای سبز، آویشن و رزماری برای بررسی اثرهای ضدباکتریایی انتخاب شدند. اثرهای ضدباکتریایی ترکیب سه عصاره بر دو سویه نیمه‌مقاوم و یک سویه مقاوم به اثبات رسید. همچنین، ثابت شد که ترکیب سه عصاره باعث کاهش MIC آنتی‌بیوتیک استاندارد می‌شود. نوع اثر متقابل ترکیب بهینه‌شده سه عصاره و آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین به‌صورت هم‌افزایی گزارش شد. یکی از دلایل احتمالی نبود سینرژیسم یا هم‌افزایی مکانیسم متفاوت آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین است که بر دیواره باکتری اثر می‌گذارد. در ادامه مطالعه، اثرهای ضد میکروبی ترکیب عصاره‌ها و آنتی‌بیوتیک استاندارد به اثبات رسید و سپس، اثر مهارتی ترکیب بهینه‌شده سه عصاره بر تشکیل بیوفیلم مطالعه شد. نتایج مطالعه حاکی از هم‌افزایی ترکیب بهینه‌شده عصاره‌ها در مهار تشکیل بیوفیلم و تبدیل آن به ساختار ضعیف‌تر است. افزایش غلظت ترکیب عصاره‌ها از ۵ به ۱۰ برابر تفاوت معناداری نشان نداد که دلیل احتمالی آن ممکن است وجود سلول‌های Persister در ساختار بیوفیلم‌ها باشد.

در مطالعه Radji [۳۳] و همکاران، اثر ضدباکتریایی چای سبز بر سویه استاندارد و سویه مقاوم به درمان *سودوموناس آئروژینوزا* بررسی شد. در این پژوهش، به‌خلاف مطالعه حاضر، اثرهای ضدباکتریایی عصاره چای سبز با روش Disk diffusion بررسی شد. همچنین، حلال مورد استفاده

در مطالعه ذکرشده آب بوده است. نتایج مطالعه انجام‌شده با مطالعه حاضر همخوانی دارد؛ اما در مطالعه ذکرشده درباره بیوفیلم پژوهشی صورت نگرفته است.

Kumar [۳۴] و همکاران، فعالیت ضد میکروبی عصاره چای سبز در برابر باکتری‌های مختلف جداشده از منابع محیطی را مطالعه کردند. باکتری‌های مختلف از نمونه‌های فاضلاب مکان‌های مختلف جمع‌آوری و جدا شدند. باکتری‌های جداشده با رنگ‌آمیزی گرم و تست‌های بیوشیمیایی شناسایی شدند. در مجموع، شش باکتری مختلف (*استافیلوکوک*، *استرپتوکوک*، *سودوموناس*، *E. coli*، پروتئوس و باسیلوس) شناسایی شدند. برای همه عصاره‌ها، فعالیت ضد میکروبی درخورد توجهی گزارش شد. نتایج این مطالعه حاکی از وسیع‌الطیف بودن اثر ضدباکتریایی عصاره چای سبز بر باکتری‌های گرم منفی و مثبت بود، هرچند سویه‌های ذکرشده در این مطالعه جزو سویه‌های نیمه‌مقاوم یا کاملاً مقاوم نبودند. روش بررسی خاصیت ضد میکروبی در این مطالعه نیز با روش بررسی در مطالعه حاضر متفاوت بود. تحقیقات Passat [۳۵] و همکاران، درباره فعالیت آنتی‌بیوتیکی عصاره آبی چای سیاه و سبز بر *E. coli* جداشده از عفونت مجاری ادراری بود. عصاره چای سبز اثر آنتاگونیستی با آمیکاسین، جنتامایسین، توبرامایسین، استرپتومایسین، سفپیم، آزیترومایسین، پپراسیلین و کانامایسین نشان داد. این عصاره روی سفرا دین، وانکومایسین، لینکومایسین، اریترومایسین، آمپی‌سیلین، پنی‌سیلین G و باسیتراسین تأثیری نداشت. در این مطالعه، فقط از یک عصاره برای بررسی اثر مداخله‌ای چای سبز استفاده شد؛ درحالی‌که در مطالعه حاضر، از اثرهای ترکیبی عصاره‌ها استفاده شده است.

Sienkiewicz [۳۶] و همکاران، در تحقیقات خود، اثر مهارتی عصاره *T. vulgaris* را در برابر گونه‌های مختلف *استافیلوکوک*، *انتروکوک*، *اشریشیا* و جنس *سودوموناس* که از بیماران مبتلا به عفونت‌های حفره دهانی، دستگاه تنفسی، دستگاه تناسلی ادراری و همچنین، از محیط بیمارستان و کارکنان بالینی جدا شده بود، بررسی کردند. فعالیت

ضدباکتریایی با استفاده از روش Disk diffusion آزمایش شد. سویه‌های استافیلوکوک حساس‌ترین و باکتری سودوموناس مقاوم‌ترین سویه‌ها بودند. در این مطالعه، همانند مطالعه حاضر، از سویه‌های کلینیکی استفاده شد. سویه‌های گرم مثبت بیشترین حساسیت و سویه گرم منفی انتخابی در این مطالعه بیشترین میزان مقاومت را نشان دادند. این نتایج بر اهمیت این مطالعه می‌افزاید؛ زیرا خاصیت ضدباکتریایی در برابر یکی از مقاوم‌ترین گونه‌ها را نشان می‌دهد.

تحقیقات دیگری نیز درباره اثر عصاره آویشن بر سویه سودوموناس *آئروژینوزا* مقاوم به درمان حاکی از اثر ضدباکتریایی محدود عصاره آویشن است [۲۷]. مطالعه Farooqui [۲۸] و همکاران، حاکی از آن بود که هیچ فعالیت ضد میکروبی چشمگیری در سایر ارگانسیم‌های گرم منفی و میکروآئروفیل‌ها، مانند سودوموناس *آئروژینوزا*، *اشریشیا کلی*، *اسینتوباکتر بولمانی*، *کلبسیلا پنومونیه*، *سیتروباکتر فروئندی* و گونه‌های شینگلا مشاهده نمی‌شود. در این مطالعه نشان داده شد که چای سبز در برابر میکروارگانسیم‌های گرم مثبت، از جمله *استافیلوکوکوس اورئوس*، *میکروکوک*، *استرپتوکوک پنومونیا* و *باسیلوس سوبتیلیس*، خاصیت ضدباکتریایی قوی‌تری دارد. در این مطالعه، به‌خلاف مطالعه حاضر، برای عصاره چای سبز خاصیتی علیه سودوموناس *آئروژینوزا* گزارش نشده است. یکی از دلایل احتمالی می‌تواند استفاده از تنها یک عصاره باشد؛ درحالی‌که در مطالعه حاضر، از ترکیب سه عصاره استفاده شده است. شایان ذکر است که در این مطالعه، سویه سودوموناس *آئروژینوزا* بررسی شده از نوع MDR بود.

بیوفیلیم به مجموعه پیچیده میکروب‌هایی اشاره می‌کند که ممکن است به یک سطح متصل شوند یا بدون چسبندگی به سطوح، به یکدیگر متصل شوند. شکل بیوفیلیم به باکتری‌ها اجازه می‌دهد تا در شرایط محیطی نامطلوب، مقاومت کنند و آن‌ها را قادر می‌سازد طیف وسیعی از بیماری‌های مزمن را ایجاد کنند؛ از این رو، تشکیل بیوفیلیم علت اصلی عفونت‌های بیمارستانی در بیماران دارای نقص ایمنی در نظر گرفته می‌شود. در مطالعات El-Sayed و همکاران [۲۷]، نشان داده شده است که گیاه چای سبز اثرهای ضدبیوفیلیمی قوی از خود نشان می‌دهد.

E. Araby و همکاران [۳۹]، در مطالعه خود درباره اثر ترکیبی رادیوترایی و عصاره رزماری بر بیوفیلیم‌ها، نتایج مشابهی گزارش کرده‌اند. در مطالعه ذکر شده، خاصیت ضدبیوفیلیمی رزماری و همچنین، اثرهای درمان ترکیبی رادیوترایی و عصاره‌ها تأیید شده است. در بررسی اثرهای ضدبیوفیلیمی گیاه آویشن در مطالعه Malwina Bro' zyna و همکاران [۴۰]، نتایج حاکی از آن است که گیاه آویشن خاصیت ضدبیوفیلیمی ضعیفی از خود نشان می‌دهد. در این مطالعه، از شش گیاه دیگر نیز استفاده شده است؛ اما ترکیب عصاره گیاهان همراه یکدیگر استفاده نشده است.

به سمی نبودن عصاره چای سبز، رزماری و آویشن در مطالعات مختلف توجه شده است [۴۲، ۴۱]. در مطالعه‌ای، اثر سمی عصاره‌های مختلف گیاهی، از جمله آویشن، بر همولیز گلبول‌های قرمز در دوز ۱۰۰ میلی گرم

بر میلی‌لیتر مطالعه شد. نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره آویشن تنها ۱/۷۲ درصد از همولیز گلبول‌های قرمز را به همراه دارد که برای انسان، ایمن در نظر گرفته می‌شود [۴۳]. علاوه بر این، نتیجه مطالعه دیگری نشان داد که عصاره آبی آویشن در صورت مصرف خوراکی، تقریباً غیرسمی است. با توجه به مطالعه سمیت مزمن، عصاره به‌طور کلی در صورت مصرف خوراکی در مدت‌زمان طولانی، بی‌خطر در نظر گرفته شده است [۴۴]. در مطالعه‌ای نیز سمیت عصاره‌های مختلف گیاهی، از جمله چای سبز، بر ماکروفاژها بررسی شد و مشخص شد که انکوباسیون با عصاره چای سبز در دوز ۱۲/۵ میلی گرم بر میلی‌لیتر به‌عنوان بالاترین غلظت به‌کاررفته به مدت ۲۴ ساعت برای ماکروفاژها سمیت سلولی ندارد [۴۵]. اگرچه این عصاره در مطالعات مختلف بر سلول‌های سرطانی، از جمله سلول‌های آدنوکارسینوما کولورکتال HT-29، سمیت نشان داده است [۴۶].

در مطالعه‌ای دیگر، سمیت دوز خوراکی تحت حاد ۲۸ روزه عصاره هیدروالکلی گیاه *Rosmarinus officinalis* در موش‌های صحرایی وistar بررسی شد. در این مطالعه، در مجموع ۴۸ موش صحرایی بررسی شدند که به گروه‌های کنترل، دوز کم (۳۰۰ mg/kg)، دوز متوسط (۵۰۰ mg/kg) و دوز بالا (۱۰۰۰ mg/kg) تقسیم شدند. عصاره هر روز و به مدت ۲۸ روز تجویز شد. در پایان مطالعه، پارامترهای بیوشیمیایی و پاتولوژیکی مختلف برای ارزیابی صدمات کلیه و کبد انجام شد. نتایج هماتولوژیک و بیوشیمی نشان داد که هیچ تغییری در گروه شاهد و تیمار مشاهده نمی‌شود. در هیستوپاتولوژی نیز ارزیابی بافت کلیه در هیچ‌یک از گروه‌های تحت درمان، ضایعات معنی‌داری ($P < 0.05$) نشان نداد. نتایج نشان داد که عصاره هیدروالکلی برگ *Rosmarinus officinalis* در بالاترین دوز (۱۰۰۰ mg/kg) برای ۲۸ روز مصرف خوراکی بی‌خطر است [۴۷].

کشف روش‌های جدید و تقویت روش‌های قدیمی می‌تواند کمک شایانی در مبارزه با باکتری‌های مقاوم به درمان داشته باشند. نتایج مطالعه اخیر حاکی از مؤثر بودن سه عصاره انتخاب‌شده بر باکتری‌های مقاوم به چنددارو است. همچنین، نشان داده شده است که این سه عصاره دارای خاصیت هم‌افزایی با یکدیگر هستند. در ادامه، نتایج پژوهش نشان داد که ترکیب سه عصاره باعث کاهش حداقل غلظت مؤثر آنتی‌بیوتیک انتخابی و جلوگیری از تشکیل نسبی بیوفیلیم توسط باکتری شده است.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که ترکیب سه عصاره چای سبز، رزماری و آویشن دارای اثرات ضدباکتریایی و بیوفیلیمی قابل توجهی می‌باشد، به علاوه، ترکیب سه عصاره با آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین خاصیت هم‌افزایی نشان می‌دهد

سپاسگزاری

نویسندگان از دانشگاه علوم پزشکی مشهد برای حمایت مالی از این طرح تشکر و قدرانی می‌کنند (کد اخلاق: IR.MUMS.MEDICAL.REC. 1398.696).

References

- Frieri M, Kumar K, Boutin A. Antibiotic resistance. J Infect Public Health. 2017;10(4):369-78. DOI: 10.1016/j.jiph.2016.08.007 PMID: 27616769
- Organization WH. Antimicrobial resistance: global report on surveillance: World Health Organization. 2014.
- Van LT, Hagiü I, Popovici A, Marinescu F, Gheorghe I, Curutiu C, et al. Antimicrobial efficiency of some essential oils in antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates. Plants. 2022;11(15):2003. DOI: 10.3390/plants11152003 PMID: 35956481
- Gonzalez MR, Fleuchot B, Lauciello L, Jafari P, Applegate LA, Raffoul W, et al. Effect of human burn wound exudate on *Pseudomonas aeruginosa* virulence. Msphere. 2016;1(2):e00111-15. DOI: 10.1128/mSphere.00111-15 PMID: 27303724
- Hauser AR. *Pseudomonas aeruginosa*: so many virulence factors, so little time. Crit Care Med. 2011;39(9):2193. DOI: 10.1097/CCM.0b013e318221742d PMID: 21849835
- Minandri F, Imperi F, Frangipani E, Bonchi C, Visaggio D, Facchini M, et al. Role of iron uptake systems in *Pseudomonas aeruginosa* virulence and airway infection. Infect Immun. 2016;84(8):2324-335. DOI: 10.1128/IAI.00098-16 PMID: 27271740
- Khodayary R, Nikokar I, Mobayen MR, Afrasiabi F, Araghian A, Elmi A, et al. High incidence of type III secretion system associated virulence factors (exoenzymes) in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Iranian burn patients. BMC Res Notes. 2019;12(1):1-6. DOI: 10.1186/s13104-019-4071-0 PMID: 30646938
- Lorusso AB, Carrara JA, Barroso CDN, Tuon FF, Faoro H, Role of efflux pumps on antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Int J Mol Sci. 2022;23(24):15779. DOI: 10.3390/ijms232415779 PMID: 36555423
- Daury L, Orange F, Taveau J-C, Verchère A, Monlezun L, Gounou C, et al. Tripartite assembly of RND multidrug efflux pumps. Nat Commun. 2016;7(1):10731. DOI: 10.1038/ncomms10731 PMID: 26867482
- Poole K. Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49(2):479-87. DOI: 10.1128/AAC.49.2.479-487.2005 PMID: 15673721
- J Wolter D, D Lister P. Mechanisms of β -lactam resistance among *Pseudomonas aeruginosa*. Curr Pharm Des. 2013;19(2):209-22. PMID: 22894618
- Wright GD. Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. Adv drug deliver rev. 2005; 57(10):1451-1470. DOI: 10.1016/j.addr.2005.04.002 PMID: 15950313
- Sandoval-Motta S, Aldana M. Adaptive resistance to antibiotics in bacteria: a systems biology perspective. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med. 2016;8(3):253-67. DOI: 10.1002/wsbm.1335 PMID: 27103502
- Taylor PK, Yeung AT, Hancock RE. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: towards the development of novel anti-biofilm therapies. J Biotechnol. 2014;191:121-30. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2014.09.003 PMID: 25240440
- Balaban NQ, Gerdes K, Lewis K, McKinney JD. A problem of persistence: still more questions than answers? Nat Rev Microbiol. 2013;11(8):587-91. DOI: 10.1038/nrmicro3076 PMID: 24020075
- Drenkard E, Ausubel FM. *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. Nature. 2002;416(6882):740-3. DOI: 10.1038/416740a PMID: 11961556
- Kunz Coyne AJ, El Ghali A, Holger D, Rebold N, Rybak MJ. Therapeutic strategies for emerging multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Infect Dis Ther. 2022;11(2):661-82. DOI: 10.1007/s40121-022-00591-2 PMID: 35150435
- Nwabuike JC, Omolo CA, Govender T. Nano delivery systems to the rescue of ciprofloxacin against resistant bacteria "E. coli; P. aeruginosa; Saureus; and MRSA" and their infections. J Control Release. 2022;349:338-53. DOI: 10.2147/IJN.S427258 PMID: 38026518
- Aziz SAAA, Mahmoud R, Mohamed MBED. Control of biofilm-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from dairy farm using Virokill silver nano-based disinfectant as an alternative approach. Sci Rep. 2022;12(1):9452. DOI: 10.1038/s41598-022-13619-x PMID: 35676412
- Fimbres-García JO, Flores-Sauceda M, Othon-Díaz ED, García-Galaz A, Tapia-Rodríguez MR, Silva-Espinoza BA, et al. Facing resistant bacteria with plant essential oils: Reviewing the oregano case. Antibiotics. 2022;11(12):1777. DOI: 10.3390/antibiotics11121777 PMID: 36551436
- Heunis TD, Smith C, Dicks LM. Evaluation of a nisin-eluting nanofiber scaffold to treat *Staphylococcus aureus*-induced skin infections in mice. Antimicrob Agents Chemother. 2013;57(8):3928-35. DOI: 10.1128/AAC.00622-13 PMID: 23733456
- Alwan S, El Omari K, Soufi H, Zreika S, Sukarieh I, Chihib N-E, et al. Evaluation of the antibacterial activity of *Micromeria barbata* in Lebanon. J Essent Oil Bear Pl. 2016;19(2):321-27. DOI: 10.1080/0972060X.2014.962623
- Intorasoot A, Chornchoem P, Sookkhee S, Intorasoot S. Bactericidal activity of herbal volatile oil extracts against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. J Intercult Ethnopharmacol. 2017;6(2):218. DOI: 10.5455/jice.20170411091159 PMID: 28512603
- Zeedan G, Abdalhamed A, Ottai M, Abdelshafy S, Abdeen E. Antimicrobial, antiviral activity and GC-MS analysis of essential oil extracted from *Achillea fragrantissima* plant growing in Sinai Peninsula. Egypt J Microb Biochem Technol S. 2014;8(6). DOI: 10.4172/1948-5948.S8-006
- Balouiri M, Sadiki M, Ibsouda SK. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. J Pharm Anal. 2016;2(6):71-9. DOI: 10.1016/j.jpha.2015.11.005 PMID: 29403965
- Lorian V. Antibiotics in laboratory medicine: Lippincott Williams & Wilkins. 2005.
- El-Sayed NR, Samir R, Jamil M. Abdel-Hafez L, Ramadan MA. Olive leaf extract modulates quorum sensing genes and biofilm formation in multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Antibiotics. 2020;9(9):526. DOI: 10.3390/antibiotics9090526 PMID: 32824901
- Deutch CE. Inhibition of urease activity in the urinary tract pathogens *Staphylococcus saprophyticus* and *Proteus mirabilis* by dimethylsulfoxide (DMSO). J Appl Microbiol. 2020;128(5):1514-23. DOI: 10.1111/jam.14560 PMID: 31860153
- Dantas DMM, Oliveira CYB, Costa R, Carneiro-da-Cunha MDG, Gálvez AO, Bezerra RS. Evaluation of antioxidant and antibacterial capacity of green microalgae *Scenedesmus subspicatus*. Food Sci Technol Int. 2019;25(4):318-26. DOI: 10.1177/1082013218825024 PMID: 30646759
- Yahya M, Alias Z, Karsani SA. Antibiofilm activity and mode of action of DMSO alone and its combination with afatinib against Gram-negative pathogens. Folia Microbiol (Praha). 2018;63(1):23-30. DOI: 10.1007/s12223-017-0532-9 PMID: 28540585
- Vivas R, Barbosa AAT, Dolabela SS, Jain S. Multidrug-resistant bacteria and alternative methods to control them: an overview. Microb Drug Resist. 2019;25(6):890-908. DOI: 10.1089/mdr.2018.0319 PMID: 30811275
- Thi MTT, Wibowo D, Rehm BH. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Int J Mol Sci. 2020;21(22):8671. DOI: 10.3390/ijms21228671 PMID: 33212950

33. 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 Pac J Trop Biomed*. 2013;3(8):663-67. DOI: [10.1016/S2221-1691\(13\)60133-1](#) PMID: 23905026
34. Kumar A, Kumar A, Thakur P, Patil S, Payal C, Kumar A, et al. Antibacterial activity of green tea (*Camellia sinensis*) extracts against various bacteria isolated from environmental sources. *Recent Research in Science and Technology*. 2012; 4(1):19-23. [Link](#)
35. Passat DN. Interactions of black and green tea water extracts with antibiotics activity in local urinary isolated *Escherichia coli*. *Al-Nahrain Journal of Science*. 2012;15(3):134-42. [Link](#)
36. Nabavi SM, Marchese A, Izadi M, Curti V, Daglia M, Nabavi SF. Plants belonging to the genus *Thymus* as antibacterial agents: From farm to pharmacy. *Food Chem*. 2015;173:339-47. DOI: [10.1016/j.foodchem.2014.10.042](#) PMID: 25466031
37. Trojanowska D, Mrowiec P, Soja Ł, Budak A. Activity of thyme oil ("Oleum Thymi") against multidrug-resistant "Acinetobacter baumannii" and "Pseudomonas aeruginosa". *Acta Pol Pharm*. 2016;73(4):975-81. PMID: 29648723
38. 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. DOI: [10.1371/journal.pone.0118431](#) PMID: 25719410
39. Araby E, El-Tablawy S. Inhibitory effects of rosemary (*Rosemarinus officinalis* L.) essential oil on pathogenicity of irradiated and non-irradiated *Pseudomonas aeruginosa*. *J Photochem Photobiol B*. 2016;159:24-32. DOI: [10.1371/journal.pone.0118431](#) PMID: 25719410
40. Brożyna M, Paleczny J, Kozłowska W, Ciecholewska-Juśko D, Parfińczyk A, Chodaczek G, et al. Chemical composition and antibacterial activity of liquid and volatile phase of essential oils against planktonic and biofilm-forming cells of *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecules*. 2022;27(13):4096. DOI: [10.3390/molecules27134096](#) PMID: 35807343
41. Frank J, George TW, Lodge JK, Rodriguez-Mateos AM, Spencer JP, Minihane AM, et al. Daily consumption of an aqueous green tea extract supplement does not impair liver function or alter cardiovascular disease risk biomarkers in healthy men. *J Nutr*. 2009;139(1):58-62. DOI: [10.3945/jn.108.096412](#) PMID: 19056646
42. Salokhe SS, Kolhe S, Tembhurne S, Hanmghar D. 28 Days repeated oral toxicity study of *Rosmarinus officinalis* in Wistar Rats. *JDDT*. 2020;10(6-s):67-74. DOI: [10.22270/jddt.v10i6-s.4616](#)
43. Mehreen A, Waheed M, Liaqat I, Arshad N. Phytochemical, antimicrobial, and toxicological evaluation of traditional herbs used to treat sore throat. *Biomed Res Int*. 2016;2016 :8503426. DOI: [10.1155/2016/8503426](#) PMID: 27429983
44. Mrabti NN, Mrabti HN, Doudach L, Khalil Z, Kachmar MR, Mekkaoui M, et al. Mineral contents, antimicrobial profile, acute and chronic toxicity of the aqueous extract of Moroccan *Thymus vulgaris* in rodents. *IJSM*. 2022;9(4):397-414. DOI: [10.21448/ijsm.1106820](#)
45. Higa KC, Jorjao AL, Oliveira FE, Oliveira JRd, Back Brito GN, Jorge C, et al. Cytotoxicity of *Cynara scolymus* (ARTICHOKE), *Myracrodruon urundeuva* (aroeira-do-sertao) and *Camellia sinensis* (green tea) glycolic extracts. *Revista Univap*. 2019;76-90. [Link](#)
46. Mehrabani M, Amirheidari B, Ahmadiania N, Forooghi-Nematollahi M, Sabouri S. Antioxidant and cytotoxic effects of aqueous extract of Iranian green tea (*Camellia sinensis* L.). *Iran J Pharm Sci*. 2022;77-86. DOI: [10.22037/ijps.v18.41381](#)