مقاله پژوهشی

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۲۱، شماره ۱۰، دی ۱۳۹۵(شماره پی در پی۱۱۷)

# اثر عصاره متانولی گیاهان بلوط، پسته وحشی و سنجد بر روی تشکیل بیوفیلم *پسودوموناس آئروژینوزا*

**آرین امیدی[۱]، اصغر شریفی[۲]**

[۱]گروه زیست شناسی، واحد یاسوج، دانشگاه آزاد اسلامی، یاسوج، ایران ، [۲]مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران

**تاریخ وصول** : ۱۳۹۵/۷/۲۵ **تاریخ پذیرش**: ۱۳۹۵/۱۰/۲۷

**چکیده**

**زمینه و اهداف**: تشکیل بیوفیلم یکی از مکانیسم‌های مهمی‌است که به مقاومت آنتی بیوتیکی در *پسودوموناس آئروژینوزا* کمک می‌کند. هدف از این مطالعه بررسی اثر عصاره متانولی جفت بلوط، برگ های پسته وحشی و سنجد بر روی تشکیل بیوفیلم سویه‌های بالینی و استاندارد *پسودوموناس آئروژینوزا* بود.

**روش بررسی**: این مطالعه یک مطالعه تجربی ـ آزمایشگاهی است، که عصاره‌گیری با روش خیساندن(مخلوط کردن پودر گیاهان با متانول ۸۰ درصد) و دستگاه روتاری اواپراتور انجام شد. حداقل غلظت مهار کنندگی عصاره‌ها با روش میکرودایلوشن براث تعیین شد. تشکیل بیوفیلم با روش میکروتیتر پلیت و رنگ‌آمیزی با کریستال ویوله بررسی شد. داده‌هایجمع‌آوری شده با استفاده از آزمون آنالیزواریانس و دانکن تجزیه و تحلیل شدند.

**یافته‌ها**: حداقل غلظت مهار کنندگی عصاره‌های جفت بلوط، پسته وحشی و سنجد علیه *پسودوموناس آئروژینوزا* ۶۲۵/ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود، حداقل غلظت کشندگی عصاره جفت بلوط ۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و برای پسته وحشی و سنجد ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. میانگین درصد مهار بیوفیلم *پسودوموناس آئروژینوزا* به وسیله عصاره‌های جفت بلوط، پسته وحشی و سنجد به ترتیب ۶۰/۲۴، ۵۷/۳۵ و ۷۲/۶۳ درصد بود.

**نتیجه‌گیری**: عصاره‌های متانولی جفت بلوط، پسته وحشی و سنجد دارای اثر ضد باکتریایی و ضد بیوفیلمی‌علیه *پسودوموناس آئروژینوزا* بودند به طوری که عصاره سنجد قابلیت بهتری در مهار بیوفیلم داشت و نسبت به عصاره های جفت و پسته وحشی اختلاف معنی‌داری نشان داد و احتمالا" با مطالعه‌های بیشتر بتوان از این عصاره ها به عنوان مکمل در مهار بیوفیلم باکتری استفاده کرد.

**واژه‌های کلیدی**: *پسودوموناس آئروژینوزا*، بیوفیلم، بلوط، پسته وحشی، سنجد

***نویسنده مسئول: اصغر شریفی**، یاسوج، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی
**Email:** asgharsharifi@yahoo.com

**مقدمه**

*پسودوموناس آئروژینوزا* یک پاتوژن گرم منفی، مهم و فرصت طلب است که می‌تواند انواع عفونت‌های بالینی شامل؛ عفونت زخم و عفونت‌های دستگاه ادراری و عفونت جریان خون را به ویژه در بیماران بستری در بیمارستان و بیماران دچار نقص سیستم ایمنی ایجاد کند. این باکتری دومین علت پنومونی اکتسابی بیمارستانی و هم‌چنین سومین علت عفونت‌های ادراری بیمارستانی در ایالات متحده آمریکا و پنجمین علت عفونت‌های ادراری بیمارستانی در اروپا می‌باشد(۱). *پسودوموناس آئروژینوزا* در برابر بسیاری از ضدعفونی کننده‌ها و آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله پنی‌سیلین‌های ضد پسودوموناس، سفتازیدیم، کاربا‌پنیم‌ها، آمینوگلیکوزیدها و سیپروفلوکساسین مقاوم است(۲). *پسودوموناس آئروژینوزا* دو نوع فاکتور بیماری‌زایی دارد که فاکتور بیماری‌زایی نوع اول شامل عوامل دخیل در عفونت حاد می‌باشد و شامل پیلی، اگزوآنزیم S، ادهسین‌ها، اگزوتوکسین A، فسفولیپاز C و تولید حداقل چهار نوع پروتئاز که باعث خون ریزی و نکروز بافتی می‌شود. فاکتورهای نوع دوم شامل عوامل دخیل در عفونت مزمن است و شامل سیدروفورها و آلژینات می‌باشد.آلژینات به تشکیل بیوفیلم باکتری در چسبیدن به سلول‌های اپیتلیال کمک می‌کند(۳). تشکیل بیوفیلم یکی از قابل توجه‌ترین مکانیسم‌هایی است که به مقاومت آنتی‌بیوتیکی در *پسودوموناس آئروژینوزا* کمک می‌کند(۴). بیوفیلم اجتماع پیچیده باکتری است که در یک پوشش گلیکوکالیکس احاطه شده و به سطوح مخاطی متصل می‌شود. تشکیل بیوفیلم به وسیله *پسودوموناس آئروژینوزا* در راه تنفسی بیماران فیبروز کیستیک، پنومونی و بیماران ریوی مزمن یکی از علت‌های مهم در طولانی شدن درمان، تشدید علایم بالینی و حتی مرگ بیماران می‌باشد(۵). در سال ۲۰۱۴ سازمان جهانی بهداشت یک گزارش در رابطه با مقاومت آنتی‌بیوتیکی منتشر کرد و این تهدید جهانی در حال افزایش است و توانایی ما برای درمان عفونت‌های بیمارستانی و یا اکتسابی از جامعه به خطر می‌افتد و افزایش بی رویه در استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در مراکز بهداشتی درمانی و یا به وسیله افرادی که خودسرانه دارو تجویز می‌کنند، می‌تواند مستعد بیماری‌های عفونی به وسیله میکروارگانیسم‌های مقاوم به چند دارو شود. بنابراین برای حل این چالش، شناسایی بررسی ترکیب‌های ضدمیکروبی موجود در عصاره گیاهان دارویی به عنوان یک منبع جدید دارویی و یک روش درمان جایگزین می‌تواند مؤثر باشد(۶). امروزه توجه به ترکیب‌های گیاهان در مقابله با میکروارگانیسم‌های پاتوژن افزایش پیدا کرده است. سابقه مصرف طولانی مدت گیاهان در طب سنتی، دسترسی ساده به گیاهان و کم هزینه بودن آنها ویژگی‌هایی هستند که باعث شده که به یک گزینه مورد توجه در مهار سویه‌های میکروبی تبدیل شوند(۷). بلوط فراوان‌ترین و مهم‌ترین گونه درختی در غرب ایران به خصوص در منطقه زاگرس است. گونه‌های مهم بلوط که در ایران رویش

دارند شامل بلوط ایرانی *Quercus.brantii*، *Q.infectoria* و *Q.libani* می‌باشد(۸). گونه *brantii* در جنگل‌های استان کهگیلویه و بویراحمد گونه غالب است. بر اساس مطالعه‌های انجام شده این گونه ۵ درصد تانن دارد(۹). بلوط یکی از گیاهان خانواده *فاگاسه* و جنس *کوئرکوس* می‌باشد میوه آن هم برای مصارف غذایی و هم در طب سنتی کاربرد زیادی دارد و حاوی ترکیب‌های بیولوژیکی فعال از جمله تانن، گالیک اسید و مشتقات هگزاهیدروکسی دی‌فنوئیل یا گالویل می‌باشد(۱۰). گیاه پسته با نام علمی *Pistacia. atlantica* از خانواده *آناکاردیاسه* (*Anacardiaceae*) می‌باشد و در مناطق مدیترانه و خاورمیانه پراکنش دارد. بخش‌های هوایی این گیاه در طب سنتی به عنوان مدر، درمان فشارخون بالا، سرفه، گلودرد، اگزما و درد معده استفاده می‌شود. برگ‌های این گیاه به دلیل ترکیب‌های فنلی دارای خواص آنتی‌اکسیدانی می‌باشد(۱۱). سنجد گیاهی با نام علمی *Elaeagnus. angustifolia* و بومی نواحی شمالی آسیا تا هیمالیا و اروپا می‌باشد. این گیاه در تهران و اطراف آن، قزوین، خراسان، غرب ایران، جنوب شرقی ایران، آذربایجان و ارومیه می‌روید. یکی از قسمت‌های این گیاه که استفاده می‌شود برگ‌های آن است، این گیاه دارای تانن، فلاوونوئید، مواد رنگی و کربوهیدرات می‌باشد. رنگ برگ‌های این گیاه نقره‌ای و میوه آن خوراکی و دارای خاصیت دارویی است(۱۲).

منصوری و همکاران فعالیت بازدارندگی عصاره گیاهان ایران را بر روی رشد و تشکیل بیوفیلم *پسودوموناس آئروژینوزا* مورد بررسی قرار دادند، آنها به این نتیجه رسیدند که بیشترین اثر ضدباکتریایی مربوط به عصاره بلوط *Q. infectoria* و عصاره *M.communis* و هم‌چنین بیشترین فعالیت ضد بیوفیلمی مربوط به عصاره *Q. infectoria* و *G. glabra* می‌باشد(۱۳).

برجیان بروجنی و همکاران اثرات ضدباکتریایی عصاره هیدروالکلی میوه بلوط (*Q.brantii*) را بر روی لیستریا منوسیتوژنز و انتروکوکوس فکالیس در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار دادند نتایج آنها نشان داد که عصاره بلوط ایرانی با دارا بودن ماده ضد میکروبی تانن بر روی این دو باکتری اثر مهارکنندگی رشد و کشندگی دارد(۱۴).

عزیزیان و همکاران در یک تحقیق فعالیت ضد باکتریایی عصاره آبی پسته وحشی را در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار دادند و دریافتند که این عصاره دارای اثر بازدارندگی علیه باکتری‌های اشرشیاکلی، *پسودوموناس آئروژینوزا* و *استافیلوکوکوس آرئوس* می‌باشد(۱۵).

در مطالعه جامه دار و همکاران برای تعیین قطر هاله ی مهار رشد باکتری *پسودوموناس آئروژینوزا* از غلظت های ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره استفاده شد و بر اساس نتایج به دست آمده عصاره آبی برگ درخت سنجد تلخ (*Hippophae rhamnoides*) در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بیشترین اثر را بر روی *پسودوموناس*

*آئروژینوزا* داشت و حداقل غلظت مهار کنندگی(MIC) عصاره برگ درخت سنجد ۱۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تعیین شد(۱۶).

دهقان و همکاران خواص ضد میکروبی عصاره سنجد(*E.angustifolia*) را بر روی سویه‌های استافیلوکوکوس آرئوس، *استرپتوکوک پنومونیه*، *کاندیدا کروزی*، *اشریشیاکلی* و *کلبسیلا پنومونه* مورد بررسی قرار دادند و نتایج آنها نشان داد که این عصاره دارای خواص ضد میکروبی علیه این سویه‌ها می‌باشد(۱۷). از آنجایی که تشکیل بیوفیلم به وسیله *پسودوموناس آئروژینوزا* در راه تنفسی بیماران فیبروز کیستیک، پنومونی و بیماران ریوی مزمن یکی از علت‌های مهم در طولانی شدن درمان، تشدید علایم بالینی و حتی مرگ بیماران می‌باشد و هم‌چنین مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های *پسودوموناس آئروژینوزا* رو به افزایش است و تشکیل بیوفیلم به وسیله این باکتری باعث افزایش مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها می‌شود، در این میان سابقه مصرف طولانی مدت گیاهان در طب سنتی، دسترسی ساده به گیاهان و کم هزینه بودن گیاهان دارویی، باعث شده که گیاهان در مهار سویه‌های میکروبی به عنوان یک گزینه مورد توجه واقع شوند، لذا هدف از این مطالعه بررسی اثر عصاره متانولی جفت بلوط، پسته وحشی و سنجد بر روی تشکیل بیوفیلم *پسودوموناس آئروژینوزا* بود.

**روش بررسی**

این مطالعه به صورت تجربی- آزمایشگاهی جهت بررسی اثر عصاره‌های متانولی جفت بلوط، پسته وحشی و سنجد بر روی تشکیل بیوفیلم *پسودوموناس آئروژینوزا* انجام شد. روش نمونه‌گیری به صورت غیر احتمالی ساده بود و حجم نمونه بر اساس جدول مورگان و فرمول کوکران تعیین شد. برای نمونه‌گیری ابتدا با مراجعه به آزمایشگاه های شهر یاسوج، تعداد ۱۰ نمونه بالینی *پسودوموناس آئروژینوزا* جمع‌آوری و در حداقل زمان ممکن به آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشکده پزشکی یاسوج انتقال داده شد. علاوه بر نمونه‌های بالینی از نمونه استاندارد PAO1 *پسودوموناس آئروژینوزا* که به وسیله دانشکده پزشکی یاسوج تهیه شده بود جهت بررسی اثر عصاره‌های جفت بلوط، پسته وحشی و سنجد بر روی تشکیل بیوفیلم این سویه نیز استفاده شد. جهت تأیید مجدد سویه‌ها از تست‌های بیوشیمیایی از جمله؛ اکسیداز، کاتالاز، اکسیداسیون - تخمیر، تولید پیگمان و رنگ‌آمیزی گرم استفاده شد.

گیاهان مورد استفاده در این مطالعه از شهر یاسوج جمع‌آوری و تعیین گونه شدند و سپس این گیاهان در دمای اتاق و دور از نور و رطوبت خشک گردیدند(۱۸). مشخصات کامل این گیاهان در جدول ۱ آمده است.

برای تهیه عصاره متانولی گیاهان از روش شریفی و همکاران و روش طباطبایی و همکاران با کمی اصلاحات جزیی استفاده شد(۲۰ و ۱۹). ابتدا گیاهان خشک شده پودر گردیدند، سپس برای تهیه عصاره متانولی ۸۰ درصد، مقدار ۲۰۰ گرم از گیاه پودر شده در ۱۰۰۰ سی‌سی متانول ۸۰ درصد ریخته شد و با روش خیساندن مخلوط شد، سپس به مدت ۴۸ ساعت بر روی شیکر در دمای اتاق قرار داده شد و در نهایت بوسیله دستگاه پمپ خلاء و دستگاه روتاری عصاره‌گیری انجام شد و عصاره بدست آمده پس از خشک شدن در یخچال نگهداری شد.

جهت تهیه غلظت مورد نیاز از عصاره ها برای تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی(MIC)، مقدار ۰/۰۲ گرم از عصاره در ۱ سی‌سی از دی متیل سولفوکساید حل گردید و با استفاده از فیلتر میلی‌پور ۰/۲۲ میکرون استریل شد و به عنوان محلول ذخیره(۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) تا زمان مصرف در ظرف شیشه‌ای استریل و تیره در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد(۷). جهت تهیه غلظت مورد نیاز از عصاره‌ها برای بررسی مهار بیوفیلم، مقدار ۰/۰۳ گرم از عصاره در ۱ سی‌سی از دی متیل سولفوکساید حل گردید و با استفاده از فیلتر میلی پور ۰/۲۲ میکرون استریل شد و به عنوان محلول ذخیره(۳۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) تا زمان مصرف در ظرف شیشه‌ای استریل و تیره در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد(۷). برای تعیین MIC از روش میکرودایلوشن براث استفاده شد(۲۱). ابتدا در هر کدام از چاهک های پلیت ۹۶ چاهگی مقدار ۹۵ میکرولیتر محیط کشت مولر هینتون براث ریخته شد. در ردیف‌های کنترل منفی(بلانک) ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت ریخته شد. در تمام چاهک‌های ستون اول ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره تهیه شده اضافه شد(در سه تکرار). بعد از این مرحله محتویات اولین چاهک ردیف اول با سمپلر به خوبی مخلوط شد، سپس ۱۰۰ میکرولیتر از آن با سمپلر به چاهک بعدی انتقال داده شد، این کار تا یک چاهک مانده به آخر به همین ترتیب انجام و ۱۰۰ میکرولیتر آخر دور ریخته شد. ردیف‌های بعدی هم به همین ترتیب انجام شد. غلظت عصاره‌ها در چاهک‌ها به ترتیب ۱۰، ۵، ۲/۵، ۱/۲۵، ۰/۶۲۵، ۰/۳۱۲ و۰/۱۵۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. در مرحله بعد سوسپانسیون میکروبی معادل نیم مک فارلند به رقت $10^{-7}$ ۱× کلنی در هر میلی‌لیتر رسانده شد و در تمام چاهک‌ها به جز چاهک‌های بلانک، مقدار ۵ میکرولیتر از سوسپانسون باکتری با رقت $10^{-7}$ ۱× کلنی در هر میلی‌لیتر ریخته شد که در نهایت غلظت باکتری هر چاهک $10^{-5}$ ۱× کلنی در هر میلی‌لیتر شد. در مرحله بعد پلیت ۹۶ چاهکی به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در آنکوباتور شیکر دار قرار گرفت. بعد از این مدت زمان، اولین چاهکی که رشد باکتری را مهار کرده بود به عنوان MIC در نظر گرفته شد. برای تعیین حداقل غلظت کشندگی(MBC) مقدار ۱۰ میکرولیتر از محتویات هر کدام از چاهک‌ها( چاهک MIC و دو چاهک قبل و دو چاهک بعد از چاهک MIC) برداشته شد و بر روی محیط نوترنیت آگار کشت داده شد(در سه تکرار) و به

مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در آنکوباتور قرار گرفت بعد از این مدت کمترین غلظت از عصاره که مانع رشد باکتری شده بود به عنوان MBC در نظر گرفته شد(۲۳ و۲۲).

برای بررسی اثر عصاره متانولی این گیاهان بر روی تشکیل بیوفیلم *پسودوموناس آئروژینوزا* از روش میکروتیتر پلیت و رنگ‌آمیزی با کریستال ویوله ۰/۱ درصد استفاده شد(۲۴). برای این کار ابتدا در هر کدام از چاهک‌ها ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت مولر هینتون براث ریخته شد و در چاهک‌های ستون اول ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره ریخته شد(در سه تکرار) و همانند روش MIC که توضیح داده شد عصاره‌ها به چاهک‌ها منتقل شدند، با این تفاوت که حجم نهایی چاهک‌ها در روش MIC برابر با ۱۰۰ میکرولیتر بود، اما برای بیوفیلم حجم نهایی هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر می‌باشد. در مرحله بعد ۱۰۰ میکرو لیتر از سوسپانسون رقیق شده باکتری با رقت $۲\times۱۰^{۶}$ کلنی در هر میلی‌لیتر به چاهک‌ها (به غیر از چاهک‌های کنترل منفی) اضافه شد؛ به طوری که در نهایت غلظت باکتری هر چاهک معادل $۱۰^{۶}$ کلنی در هر میلی‌لیتر بود. چاهک‌های کنترل مثبت شامل ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت و ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری بود و هیچ‌گونه عصاره‌ای وجود نداشت در چاهک‌های کنترل منفی فقط ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت ریخته شد و چاهک‌های تیمار شامل محیط کشت، عصاره و باکتری بود. پلیت ۹۶ چاهکی به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در آنکوباتور قرار گرفت.

بعد از ۲۴ ساعت محتویات چاهک‌ها به آرامی خالی شد و سه مرتبه با سدیم کلرید ۹ درصد شستشو داده شد و میکروتیتر پلیت در دمای اتاق خشک گردید. سپس به هر کدام از چاهک‌ها ۲۰۰ میکرولیتر متانول اضافه شد تا جمعیت بیوفیلمی‌تثبیت شود، بعد از ۱۵ دقیقه متانول چاهک‌ها دور ریخته شد و پلیت ۹۶ چاهکی در دمای اتاق خشک گردید. سپس به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر کریستال ویوله ۰/۱ درصد به مدت ۵ دقیقه اضافه شد، سپس رنگ‌های اضافی با جریان ملایم آب شسته شد و پلیت ۹۶ چاهکی در دمای اتاق خشک گردید. در مرحله بعد به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر اسید استیک گلاسیال ۳۳ درصد اضافه شد و رنگ‌های متصل به چاهک در اسید حل گردید، سپس به وسیله دستگاه الایزا ریدر میزان جذب نوری در ۶۳۰ نانومتر خوانده شد.

سنجش درصد کاهش تولید بیوفیلم *پسودوموناس آئروژینوزا* بر اساس فرمول زیر محاسبه شد(۲۴).

درصد کاهش = { ((ODC-ODB)-( ODT-ODB))/(ODC-ODB) } ×۱۰۰

تولید بیوفیلم؛ ODC: جذب نوری چاهک کنترل مثبت، ODB: جذب نوری چاهک بلانک (کنترل منفی) وODT: جذب نوری چاهک تیمار با عصاره

همه آزمون‌ها در این مطالعه با سه تکرار انجام شد. داده‌های این مطالعه با استفاده از نرم افزار آماری SPSS و آزمون تحلیل واریانس و آزمون دانکن در سطح ۰/۰۵ آنالیز شدند(۲۴).

**جدول شماره ۱. مشخصات گیاهان مورد استفاده در این مطالعه.**

| نام فارسی | نام علمی‌گیاه | گونه | خانواده | محل جمع آوری گیاه | قسمت مورد استفاده |
|---|---|---|---|---|---|
| بلوط | *Quercus brantii* | *Q. brantii* | *Fagaceae* | یاسوج | جفت |
| پسته وحشی | *Pistacia atlantica* | *P. atlantica* | *Anacardiaceae* | یاسوج | برگ ها |
| سنجد | *Elaeagnus angustifolia* | *E. angustifolia* | *Elaeagnaceae* | یاسوج | برگ ها |

**یافته‌ها**

نتایج تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی و حداقل غلظت کشندگی عصاره‌های متانولی جفت بلوط، پسته وحشی و سنجد علیه سویه‌های بالینی و سویه استاندارد *پسودوموناس آئروژینوزا* نشان داد که این عصاره ها قابلیت مهار کنندگی و کشندگی خوبی علیه *پسودوموناس آئروژینوزا* دارند(جدول ۲).

در بین ۱۰ سویه بالینی *پسودوموناس آئروژینوزا*، ۵ سویه قادر به تشکیل بیوفیلم بودند و همچنین علاوه بر این، سویه استاندارد PAO1 *پسودوموناس آئروژینوزا* نیز توانایی تشکیل بیوفیلم را داشت. میزان جذب نوری بررسی تشکیل بیوفیلم سویه‌های *پسودوموناس آئروژینوزا* در محدوده جذب نوری ۰۶/ تا ۰۷/ برای منفی(عدم تشکیل بیوفیلم) و در محدوده ۱۴۱/ تا ۴۳۹/ برای مثبت(تشکیل بیوفیلم) به دست آمد. بررسی اثر این عصاره‌ها بر روی تشکیل بیوفیلم *پسودوموناس آئروژینوزا* نشان داد که در شرایط آزمایشگاهی عصاره متانولی جفت بلوط، پسته وحشی و سنجد بر روی تشکیل بیوفیلم *پسودوموناس آئروژینوزا* نیز مؤثر است. نتایج اثر غلظت‌های مختلف این عصاره‌ها بر روی تشکیل بیوفیلم *پسودوموناس آئروژینوزا* در جدول ۳ آمده است. بررسی اثر عصاره متانولی جفت بلوط بر روی تشکیل بیوفیلم *پسودوموناس آئروژینوزا* نشان داد که این عصاره بر روی تشکیل بیوفیلم *پسودوموناس آئروژینوزا* مؤثر است و این عصاره به طور میانگین ۶۰/۲۴ درصد تشکیل بیوفیلم *پسودوموناس آئروژینوزا* را مهار کرد. عصاره متانولی پسته وحشی نیز به طور میانگین ۵۷/۳۵ درصد تشکیل بیوفیلم *پسودوموناس آئروژینوزا* را مهار کرد. همچنین در بررسی اثر عصاره متانولی سنجد بر روی تشکیل بیوفیلم *پسودوموناس آئروژینوزا*، نتایج نشان داد که این عصاره قابلیت بهتری در مهار بیوفیلم *پسودوموناس آئروژینوزا* دارد و به طور میانگین ۷۲/۶۳ درصد تشکیل بیوفیلم *پسودوموناس آئروژینوزا* را مهار کرد.

بر اساس آنالیز آماری انجام شده بر روی تأثیر عصاره‌های جفت بلوط، پسته وحشی و سنجد علیه تشکیل بیوفیلم *پسودوموناس آئروژینوزا*، عصاره سنجد نسبت به عصاره‌های جفت بلوط و پسته وحشی تفاوت معنی‌داری نشان داد($p=۰/۰۰۱$). مقایسه تأثیر عصاره‌های این گیاهان بر روی تشکیل بیوفیلم *پسودوموناس آئروژینوزا* در نمودار ۱ آمده است. در رابطه با اثر عصاره متانولی سنجد بر روی تشکیل بیوفیلم سویه‌های بالینی و سویه استاندارد

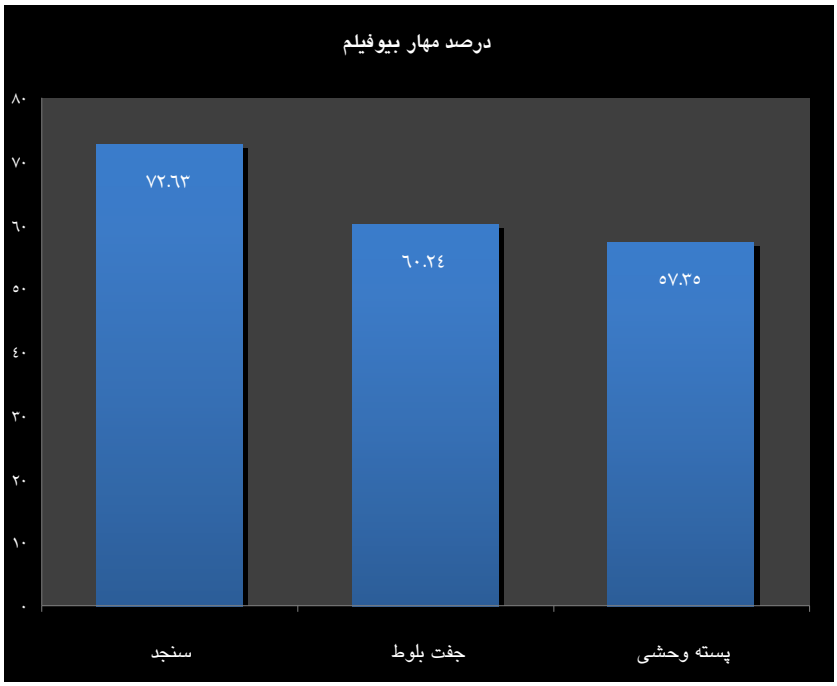
*پسودوموناس آئروژینوزا* تفاوت معنی‌داری بین سویه‌های بالینی و سویه استاندارد PAO1 مشاهده نشد(p=۰/۶۲) به طوری که در رابطه با اثر عصاره‌های متانولی جفت بلوط و پسته وحشی بر روی تشکیل بیوفیلم سویه‌های بالینی و سویه استاندارد *پسودوموناس آئروژینوزا*، بین سویه‌های بالینی و سویه استاندارد PAO1 تفاوت معنی‌داری وجود داشت(p=۰/۰۰۱).

**جدول ۲: نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی عصاره های متانولی جفت بلوط، پسته وحشی و سنجد علیه *پسودوموناس آئروژینوزا*. مقادیر بر حسب میلی گرم بر میلی لیتر می‌باشد.**

| سویه | جفت بلوط | | پسته وحشی | | سنجد | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | حداقل غلظت مهارکنندگی | حداقل غلظت کشندگی | حداقل غلظت مهارکنندگی | حداقل غلظت کشندگی | حداقل غلظت مهارکنندگی | حداقل غلظت کشندگی |
| استاندارد | /۶۲۵ | ۱/۲۵ | ۱/۲۵ | ۲/۵ | ۱/۲۵ | ۲/۵ |
| ۱بالیبی | /۶۲۵ | ۱/۲۵ | /۶۲۵ | ۱/۲۵ | /۶۲۵ | ۱/۲۵ |
| ۲ بالینی | /۶۲۵ | ۱/۲۵ | /۶۲۵ | ۲/۵ | ۱/۲۵ | ۲/۵ |
| ۳ بالینی | /۶۲۵ | ۱/۲۵ | ۱/۲۵ | ۲/۵ | ۱/۲۵ | ۲/۵ |
| ۴ بالینی | /۶۲۵ | /۶۲۵ | /۶۲۵ | ۱/۲۵ | /۶۲۵ | ۱/۲۵ |
| ۵ بالینی | /۶۲۵ | /۶۲۵ | /۶۲۵ | ۱/۲۵ | /۶۲۵ | ۱/۲۵ |
| ۶ بالینی | /۶۲۵ | ۱/۲۵ | /۶۲۵ | ۱/۲۵ | /۶۲۵ | ۱/۲۵ |
| ۷ بالینی | /۶۲۵ | ۱/۲۵ | /۶۲۵ | ۱/۲۵ | ۱/۲۵ | ۲/۵ |
| ۸ بالینی | /۶۲۵ | ۱/۲۵ | /۶۲۵ | ۲/۵ | ۱/۲۵ | ۲/۵ |
| ۹ بالینی | /۶۲۵ | ۱/۲۵ | /۶۲۵ | ۱/۲۵ | ۱/۲۵ | ۲/۵ |
| ۱۰ بالینی | /۶۲۵ | ۱/۲۵ | ۱/۲۵ | ۲/۵ | ۱/۲۵ | ۱/۲۵ |

**جدول ۳: درصد مهار تشکیل بیوفیلم *پسودوموناس آئروژینوزا* به وسیله غلظت‌های مختلف عصاره متانولی جفت بلوط، پسته وحشی و سنجد**

| عصاره | غلظت(میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) سویه | ۷/۵ | ۳/۷۵ | ۱/۸۷ | ۰/۹۳ | ۰/۴۶ | ۰/۲۳ | ۰/۱۱ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | استاندارد | ۴۲/۱ | ۳۲/۳ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ |
| جفت بلوط | ۲ بالینی | ۸۹/۶ | ۸۷/۱ | ۸۶/۹ | ۷۴/۳ | ۶۷/۹ | ۶۳/۲ | ۵۶/۸ |
| | ۵ بالینی | ۸۹/۴ | ۸۵/۹ | ۸۵/۶ | ۸۵/۳ | ۸۴/۳ | ۵۸/۹ | ۳۷/۸ |
| | ۷ بالینی | ۸۵/۵ | ۷۹/۵ | ۷۹ | ۷۸/۱ | ۷۷/۲ | ۷۳/۹ | ۶۵/۱ |
| | ۸ بالیینی | ۷۷/۹ | ۷۱/۵ | ۶۸/۸ | ۶۷/۸ | ۶۵/۱ | ۶۴/۲ | ۵۴/۱ |
| | ۱۰ بالینی | ۷۱/۹ | ۶۶/۲ | ۵۷/۳ | ۵۳/۹ | ۵۰/۵ | ۴۸/۳ | ۴۷/۱ |
| پسته وحشی | استاندارد | ۶۴/۷ | ۶۴/۷ | ۶۱/۷ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ |
| | ۲ بالینی | ۹۲/۷ | ۹۲/۲ | ۸۹/۹ | ۸۶/۶ | ۷۹/۱ | ۶۸/۸ | ۳۵/۳ |
| | ۵ بالینی | ۹۵/۵ | ۹۵/۵ | ۹۲/۶ | ۸۷/۸ | ۷۲/۲ | ۳۵/۳ | ۲۸/۹ |
| | ۷ بالینی | ۸۵/۱ | ۸۳/۲ | ۸۲/۲ | ۵۷/۴ | ۵۵/۵ | ۵۴ | ۴۰/۶ |
| | ۸ بالینی | ۶۱/۲ | ۵۹/۴ | ۵۶/۸ | ۵۶ | ۵۵/۱ | ۵۴/۳ | ۵۲/۵ |
| | ۱۰ بالینی | ۶۰/۸ | ۵۴ | ۵۰ | ۴۵/۹ | ۴۳/۲ | ۳۵/۱ | ۲۲/۹ |
| سنجد | استاندارد | ۱۰۰ | ۹۴/۱ | ۸۰/۲ | ۵۰ | ۴۱/۸ | ۳۶ | ۳۶ |
| | ۲ بالینی | ۱۰۰ | ۱۰۰ | ۱۰۰ | ۹۵/۹ | ۸۳ | ۷۵/۵ | ۳۹/۷ |
| | ۵ بالینی | ۹۸/۴ | ۹۸/۴ | ۹۸ | ۹۳/۹ | ۶۸/۷ | ۴۱/۷ | ۲۸ |
| | ۷ بالینی | ۹۴/۷ | ۹۳/۷ | ۹۳/۳ | ۷۱/۷ | ۶۲/۲ | ۵۵/۵ | ۲۳/۹ |
| | ۸ بالینی | ۸۹/۶ | ۸۸/۷ | ۷۰/۶ | ۶۶/۳ | ۵۷/۷ | ۵۵/۱ | ۵۰ |
| | ۱۰ بالینی | ۹۵/۹ | ۸۹/۱ | ۷۸/۳ | ۷۵/۶ | ۷۱/۶ | ۵۹/۴ | ۴۸/۶ |




**نمودار ۱: مقایسه اثر مهار کنندگی بیوفیلم *پسودوموناس آئروژینوزا* به وسیله عصاره متانولی گیاهان دارویی بلوط، پسته وحشی و سنجد**

## بحث

در این مطالعه اثر عصاره متانولی گیاهان دارویی بلوط، پسته وحشی و سنجد بر روی تشکیل بیوفیلم *پسودوموناس آئروژینوزا* به روش میکروتیتر پلیت و رنگ‌آمیزی با کریستال ویوله مورد بررسی قرار گرفت. بررسی اثر این عصاره‌ها بر روی تشکیل بیوفیلم نشان داد که عصاره هر سه گیاه مورد مطالعه علاوه بر خواص ضد میکروبی بر روی تشکیل بیوفیلم *پسودوموناس آئروژینوزا* مؤثر می‌باشد. میزان مهار بیوفیلم به وسیله عصاره‌های جفت بلوط، پسته وحشی و سنجد به غلظت وابسته بود و با افزایش غلظت درصد مهار بیوفیلم افزایش پیدا کرد. مقایسه این گیاهان با یکدیگر نشان داد که بیشترین درصد مهار بیوفیلم مربوط به عصاره متانولی سنجد می‌باشد. در بررسی‌های دیگر قابلیت عصاره این گیاهان در کاهش بیوفیلم تأیید شده است. نتایج مطالعه کوسری و همکاران در سال نشان داد که عصاره بلوط گونه *Quercus. infectoria* بر روی تشکیل بیوفیلم استافیلوکوکوس آرئوس مقاوم به متی سیلین مؤثر است(۲۵). در مطالعه هابی و همکاران در رابطه با اثر عصاره بلوط بر روی تشکیل بیوفیلم *استافیلوکوکوس آرئوس* مشخص گردید که عصاره بلوط باعث مهار ۱۰±۶۳ درصد بیوفیلم *استافیلوکوکوس آرئوس* شد(۲۶). محمدی و همکاران در یک مطالعه ثابت کردند که گال دارمازو *Q.infectoria* به شدت تشکیل بیوفیلم *استرپتوکوک موتانس* را در غلظت بالاتر از ۱۹/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر مهار می‌کند(۲۷). حسینی و همکاران در یک مطالعه فعالیت

ضد میکروبی عصاره صمغ بنه را بر روی بیوفیلم *استرپتوکوک موتانس* مورد بررسی قرار دادند، مطالعه آنها نشان داد که عصاره صمغ بنه باعث کاهش بیوفیلم *استرپتوکوک موتانس* می‌شود(۱۱). نتایج حاصل از این مطالعه با مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد. از نتایج قابل توجه در مطالعه حاضر اثر مهار کنندگی و کشندگی این عصاره‌ها بر روی *پسودوموناس آئروژینوزا* بود که مقدار MIC برای عصاره جفت بلوط، پسته وحشی و سنجد ۰/۶۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. هم‌چنین مقدار MBC برای جفت بلوط ۱/۲۵ میلی گرم بر میلی‌لیتر و برای پسته وحشی و سنجد ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد، که این مقادیر تأیید کننده قابلیت مهارکنندگی و کشندگی مناسب عصاره متانولی این گیاهان علیه *پسودوموناس آئروژینوزا* می‌باشد. در مطالعه‌های دیگر نیز قابلیت مهار کنندگی و کشندگی این عصاره ها مورد بررسی قرار گرفته است به طوری که جودکی و همکاران در یک مطالعه اثر مهاری عصاره آبی بلوط (*Q.coccifera*) را بر روی *استافیلوکوکوس آرئوس* و *پسودوموناس آئروژینوزا* مورد بررسی قرار دادند و میزان MIC و MBC را برای *پسودوموناس آئروژینوزا* به ترتیب ۱۰و ۱۷/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آوردند(۲۸). برجیان بروجنی و همکاران نیز اثرات ضد باکتریایی عصاره هیدرو الکلی میوه بلوط را بر روی *لیستریا منوسیتوژنز* و *انتروکوکوس فکالیس* مورد مطالعه قرار دادند و میزان MIC و MBC عصاره را برای *لیستریا منوسیتوژنز* به ترتیب ۲ و ۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و برای *انتروکوکوس فکالیس* به ترتیب ۲ و ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تعیین کردند(۱۴). در مطالعه دیگر از قادری قهفرخی و همکاران در رابطه با بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره‌های اتانولی میوه دو واریته بلوط بر باکتری‌های مواد غذایی با روش میکرو دایلوشن مشخص شد که هر دو عصاره در مقابل تمام باکتری‌های مورد بررسی اثر مهار کنندگی و کشندگی قابل قبولی دارند(۲۹). شیالی و همکاران در مطالعه‌ای دیگر مقدار MIC عصاره میوه و برگ بنه را برای قارچ‌های *کاندیدا* و *آسپرژیلوس* در محدوده ۶/۲۵ تا ۱۲/۵ و ۱۲/۵ تا ۲۵ میلی گرم بر میلی‌لیتر به دست آوردند(۳۰). در مطالعه عزیزیان و همکاران بر روی فعالیت ضد باکتریایی عصاره آبی پسته وحشی (*P. atlantica*) در شرایط آزمایشگاهی مقدار MIC برای *پسودوموناس آئروژینوزا* ۱۰۴/۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد(۱۵) در صورتی که در مطالعه حاضر MIC عصاره متانولی پسته وحشی برای *پسودوموناس آئروژینوزا* ۰/۶۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. جامعه دار و همکاران در یک مطالعه اثر ضد باکتری عصاره‌های آبی گیاهان بومی ایران را بر روی سویه استاندارد *پسودوموناس آئروژینوزا* مورد بررسی قرار دادند و بیشترین اثر ضد باکتریایی در مطالعه آنها مربوط به عصاره سنجد بوده است(۱۶). سبیر و همکاران در یک بررسی بر روی فعالیت ضد باکتریایی سنجد زینتی (*Elaeagnus umbellate*) مشخص کردند که عصاره اتری گل سنجد علیه

باکتری‌های *اشریشیاکلی*، *پسودوموناس آئروژینوزا*، *استافیلوکوکوس آرئوس* و *باسیلوس سابتیلیس* مؤثر می‌باشد و عصاره آبی میوه‌های آن قادر به مهار رشد *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس آرئوس* می‌باشد. در حالی که *پسودوموناس آئروژینوزا* مقاوم به چند دارو به طور کامل به عصاره آبی مقاومت نشان داد و عصاره استونی میوه‌ها اثر خوبی روی *پسودوموناس آئروژینوزا* داشت(۳۱). نتایج این مطالعه‌ها با نتایج حاصل از مطالعه ما هم‌خوانی دارد و تأیید کننده اثر مهار کنندگی و کشندگی عصاره‌های جفت بلوط، پسته وحشی و سنجد علیه *پسودوموناس آئروژینوزا* می‌باشد. تفاوت جزئی در مقادیر MIC و MBC به دست آمده از این مطالعه با سایر مطالعه‌ها احتمالاً به دلیل استفاده از قسمت‌های متفاوت گیاه مانند برگ‌ها، میوه، گل، صمغ، تفاوت در گونه گیاه و نوع سویه میکروبی مورد مطالعه می‌باشد.

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که عصاره متانولی جفت بلوط، پسته وحشی و سنجد در شرایط آزمایشگاهی علاوه بر اثر ضد باکتریایی دارای اثر ضد بیوفیلمی‌علیه *پسودوموناس آئروژینوزا* بودند و باعث کاهش تشکیل بیوفیلم این باکتری گردیدند و با توجه به این که مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی روز به روز در حال افزایش است و تشکیل بیوفیلم به وسیله *پسودوموناس آئروژینوزا* باعث افزایش مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها می‌شود، احتمالاً با مطالعه‌های بیشتر و کارهای بیشتر بر روی این گیاهان در آینده بتوان از این گیاهان به عنوان مکمل‌های درمانی در کنار آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده کرد.

**تقدیر و تشکر**

این تحقیق حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی واحد یاسوج می‌باشد که در آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشکده پزشکی یاسوج انجام شد، لذا از دانشگاه آزاد اسلامی‌واحد یاسوج، دانشکده پزشکی یاسوج، کارشناسان آزمایشگاه میکروب شناسی، راضیه محسنی و مرضیه طاهری‌پور و هم‌چنین مرکز تحقیقات گیاهان دارویی تشکر و قدر دانی می‌شود.

**REFERENCES**

1.Vaez H, Faghri J, Esfahani BN, Moghim S, Fazeli H, et al. Antibiotic resistance patterns and genetic diversity in clinical isolates of pseudomonas aeruginosa isolated from patients of a referral hospital, Isfahan, Iran. *Jundishapur journal of microbiology* 2015; 8(8): 1-6.
2.Shaikh S, Fatima J, Shakil S, Rizvi SMD, Kamal MA. Prevalence of multidrug resistant and extended spectrum beta-lactamase producing Pseudomonas aeruginosa in a tertiary care hospital. *Saudi Journal of Biological Sciences* 2015; 22: 62-4.
3.Khalifa ABH, Moissenet D, Thien HV, Khedher M. Les facteurs de virulence de Pseudomonas aeruginosa: mécanismes et modes de régulations. *Proc. Annales De Biologie Clinique 2011*; 69(5): 393-403.
4.Oglesby-Sherrouse AG, Djapgne L, Nguyen AT, Vasil AI, Vasil ML. The complex interplay of iron, biofilm formation, and mucoidy affecting antimicrobial resistance of Pseudomonas aeruginosa. *Pathogens and Disease* 2014; 70(3): 307-20.
5.Ghotaslou R, Salahi Eshlaqghi B. Biofilm of *pseudomonas aeruginosa* and new preventive measures and anti- biofilm agents. *J Rafsanjan Univ Med Sc*i 2013; 12(9): 747-68.
6.Ulloa-Urizar G, Aguilar-Luis MA, De Lama-Odría MdC, Camarena-Lizarzaburu J, del Valle Mendoza J. Antibacterial activity of five Peruvian medicinal plants against Pseudomonas aeruginosa. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2015; 11(5): 928-31.
7.Mohsenipour Z, Hassanshahian M. The antimicrobial effects of the alcoholic extracts of pomegranate (punica granatum) on the planktonic forms and biofilm structures of six pathogenic bacteria. J Babol Univ Med Sci 2015; 17(1): 77-84.
8.Mirabolfathy M. Outbreak of charcoal disease on Quercus SPP. and Zelkova Carpinifolia trees in forests of Zagros and Alborz mountains in Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology* 49: 257-63.
9.Nikrooze L, Jafari Barmak M, Naghmachi M, Dehghani N. Study of Jaft aqueous extract and silver sulfadiazine on burn healing in male rat. *Armaghane Danesh* 2013; 18: 107-14.
10.Ghaderi Ghahfarokhi M, Sadeghi Mahoonak A, Alami M, Ghorbani M, Azizi M. Determmination of antiradical activity. *Reducing power and total antioxidant activity of phenolic extracts of acorn fruit (q. branti ver persica. Journal of Food Research 2011*; 21: 93-104.
11.Hosseini F, Adlgostar A, Sharifnia F. Antibacterial activity of Pistacia atlantica extracts on Streptococcus mutans biofilm. Int Res J Biological Sci 2013; 2(2):1-7.
12.Moezzi N, Varzi H, Shirali S. Comparing the effect of elaeagnus angustifolia L. Extract and Lowsonia intermis L. paste, with silver sulfadiazine ointment on wound healing in rat. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants 2009; 25(2): 253-60.
13.Mansouri S, Safa A, Najar SG, Najar AG. Inhibitory activity of Iranian plant extracts on growth and biofilm formation by Pseudomonas aeruginosa. Malaysian J Microbiol 2013; 9(2): 176-83.
14.Borjian-Borujeni S, Kaveh Baba Heidari E, Mortezaei S, Borjian-Borujeni M, Validi M. Study antibacterial effects of hydroalcoholic extract of acorn fruit´s (*Quercus branti*) against *Listeria monocytogenes* and *Enterococcus faecalis* in vitro. J Shahrekord Univ Med Sci 2016; 17: 98-106.
15.Azizian MI, Pakzad I, Azizian R, Azizi Jalilian FR, Taherikalani M, Sadeghifard N, MAHMADI Kartalaie M, et al. Antibacterial effect of hydro-extract of pistacia atlantica on bacteria in in vitro. Biomedical & Pharmacology Journal 2013; (6)2, 133-136.
16.Jamehdor S, Zarabi M, Mehrnejad F. In vitro Evaluation of antibacterial efficacy of aqueous extracts of Iranian Native Plants on the Standard Strains of Pseudomonas aeruginosa. Iranian Journal of Medical Microbiology 2014; 8(2): 51-4.
17.Dehghan MH, Soltani J, Farnad M, Kalantar E, Kamalinejad M, Khodaii Z, et al. Characterization of an antimicrobial extract from elaeagnus angustifolia. International Journal of Enteric Pathogens 2014; 2(3): 1-4.
18.Valle DL, Andrade JI, Puzon JJM, Cabrera EC, Rivera WL. Antibacterial activities of ethanol extracts of Philippine medicinal plants against multidrug-resistant bacteria. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine 2015; 5(7): 532-40.
19.Sharifi A, Gorjipour R, Gorjipour A, Mohammadi R, Jabarnejad A. Antifungal effect of quercus infectoria gall (oak) on saprolegnia fungi. Armaghane Danesh 2012; 17(1): 78-84.
20.Tabatabaei Yazdi F, Alizade Behbahani B, Heidari Sureshjani M. The comparison of antimicrobial effects of Chevil (Ferulago angulata) extract with a variety of common therapeutic antibiotics in vitro. Arak Medical University Journal 2014; 17(3): 35-46.
21.Bokaeian M, Farazmand R, Kyghobadi S, Saeidi S. Study of the antimicrobial activity of *allium sativum* extract on *staphylococcus aureus* strains resistant to different antibiotics. Journal Of Plant Researches (Iranian Journal of Biology) 2015; 28(1): 34-41.

22.Akbarian J, Khomeiri M, Sadeghi MA, Mahmoodi E. Antimicrobial effect of extracts phoenix dactylifera against pathogenic bacteria and spoilage molds. Electronic Journal of Food Processing and Preservation 2013; 5(1): 1-12.
23.Ahmady-Asbchin S, Nasrolahi Omran A, Jafari N, Mostafapour MJ, Kia SM. Antibacterial effects of Lavandula Stoechas Essential Oil, on Gram Positive and Negative Bacteria. Medical Laboratory Journal 2012; 6(2): 35-41.
24.Habibipour R, Moradi Haghgou L. Study on hydro-alcoholic extract effect of pomegranate peel on pseudomonas aeruginosa biofilm formation. *Scientific Journal of Hamadan University of Medical Sciences* 2015; 22(3):195-202.
25. Chusri S, Phatthalung PN, Voravuthikunchai S. Anti-biofilm activity of Quercus infectoria G. Olivier against methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Letters in applied Microbiology 2012;* 54: 511-7.
26.Hobby GH, Quave CL, Nelson K, Compadre CM, Beenken KE, Smeltzer MS. Quercus cerris extracts limit Staphylococcus aureus biofilm formation. *Journal of Ethnopharmacology* 2012; 144: 812-815
27.Mohammadi-Sichani M, Karbasizadeh V, Chaharmiri Dokhaharani S. Effect of oak galls extracts on streptococcus mutans growth and biofilm formation. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences* 2015; 24: 161-71.
28.Judaki A, Panahi J, Havasian MR, Tajbakhsh P, Roozegar MA. Study of the inhibitory effect of Quercus Coccifera's aqueous extract on Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa In vitro. Bioinformation 2014; 10(11): 689-92.
29.Ghaderi GM, Sadeghi MA, Alami M, Khomeiri M, Mamashloo S. Evaluation of antimicrobial activity of the ethanolic extracts from Q. branti and Q. Castaneifolia Fruit Against Some Food-Borne Pathogens By Microdilution Method 2012; 9(1): 81-95.
30.Shialy Z, Zarrin M, Sadeghi-Nejad B, Yusef Naanaie S. In vitro antifungal properties of Pistacia atlantica and olive extracts on different fungal species. Current Medical Mycology 2015; 1(4): 40-5.
31.Sabir MS, Ahmad DS, Hussain IM, Tahir KM. Antibacterial activity of Elaeagnus umbellata (Thunb.) a medicinal plant from Pakistan. Saudi Medical Journal 2007; 28(2): 259-63.

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)

Original Article

# The Effect of Methanolic Extracts of Plants *Quercus brantii, Pistacia atlantica* and *Elaeagnus angustifolia* on Biofilm Formation of *Pseudomonas aeruginosa*

**Omidi A[1], Sharifi A[2*]**

[1]Department of Biology, Yasuj Branch, Islamic Azad University, Yasuj, Iran, [2]Cellular and Molecular research center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran

Received: 16 Oct 2016 Accepted: 16 Jan 2017

**Abstract**

**Background and aim**: Biofilm formation is one of the most notable mechanisms that contributes to antibiotic resistance in *P.aeruginosa* , The aim of this study was to determine the effects of methanol extrac of *Quercus brantii, Pistacia atlantica*, *Elaeagnus angustifolia* Leaves on biofilm formation *P. aeruginosa* strains.

**Methods:** this study is an experimental study, that extraction with Maceration (powder mixed with 80% methanol) using rotary evaporator method. done. The minimum inhibitory concentration of extracts was determined by broth microdilution. Biofilm formation was investigated using the microtiter plate and stained with crystal violet. Collected data were analyzed using ANOVA and Duncan test.

**Results:** The minimum inhibitory concentration of *Quercus brantii, Pistacia atlantica*, *Elaeagnus angustifolia* extracts against *Pseudomonas aeruginosa* was 0.625 mg/ml whereas, the Minimum bactericidal concentration of *Quercus brantii* jaft was 1.25 mg/ml and for *Pistacia atlantica* and *Elaeagnus angustifolia* were 2.5 mg/ml. The mean percentage of of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm inhibition by extracts of *Quercus brantii* (*jaft), Pistacia atlantica*, *Elaeagnus angustifolia* were 60.24, 57.35, and 72.63 % respectively.

**Conclusion:** Methanolic extracts of medicinal plants *Quercus brantii*, *Pistacia atlantica*, *Elaeagnus angustifolia* has anti-bacterial and anti-biofilm effect against *Pseudomonas aeruginosa* .So that *Elaeagnus angustifolia* extract had a capability to inhibit biofilm formation and also showed a significant difference compare to *Quercus brantii* jaft, *Pistacia atlantica* extract. With further study it can be used of these extracts as a supplement to inhibit bacterial biofilm.

**Key words:** *Pseudomonas aeruginosa*, biofilm, *Quercus brantii*, *Pistacia atlantica*, *Elaeagnus angustifolia*

***Corresponding Autho**r: **Sharifi A,** Cellular and Mollecular research center, Faculty of Medicine, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran
**Email**: asgharsharifi@yahoo.com

**Please cite this article as follows:**
Omidi A, Sharifi A. The Effect of Methanolic Extracts of Plants Quercus brantii, Pistacia atlantica and Elaeagnus angustifolia on Biofilm Formation of Pseudomonas aeruginosa. Armaghane-danesh 2017; 21 (10): 999-1012.