Complementary Medicine Journal
Arak University of Medical Sciences

April 2022. Vol 12. Issue 1

Research Paper

In Vitro Comparison of the Effects of Ailanthus Altissima and Salvia Nemorosa Extracts on Pseudomonas Aeruginosa, Staphylococcus Aureus, and Proteus Vulgaris

Sepideh Farazandeh[1], *Razieh Taghavizad[1], Shiva Khalil_Moghaddam[1]

1. Department of Biology, Yadegar-e-Imam Khomeini (RAH) Shahre-Rey Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Use your device to scan and read the article online

Citation: Farazandeh S, Taghavizad R, Khalil_Moghaddam S. [In Vitro Comparison of the Effects of Ailanthus altissima and Salvia Nemorosa Extracts on Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, and Proteus Vulgaris (Persian)]. Complementary Medicine Journal. 2022; 12(1):28-43. https://doi.org/10.32598/cmja.12.1.1092.1

https://doi.org/10.32598/cmja.12.1.1092.1

CC BY NC

Article Info:

Received: 14 Jul 2021

Accepted: 06 Feb 2022

Available Online: 01 Apr 2022

Key words:
Aqueous extract, Ailanthus altissima, disinfection, Salvia nemorosa

ABSTRACT

Objective Some plants have antiseptic properties with no harm to humans or animals. In this study, we aim to assess the effects of Ailanthus altissima and Salvia nemorosa extracts on Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, and Proteus vulgaris in vitro.

Methods Ailanthus altissima leaves and flowered branch of Salvia nemorosa were collected and dried in shade and powdered. Their aqueous, hydroalcoholic and methanolic extracts were prepared separately from the plants by Maceration method at four concentrations of 20, 30, 40, 50 mg/mL which were used in Mueller-Hinton Agar culture medium by the well diffusion method. Saponin was extracted was using 20% ethanol. The statistical results were analyzed in GraphPad Prism v.7 software.

Results The aqueous extract of Salvia nemorosa was more effective on Pseudomonas aeruginosa (mean non-growth halo diameter = 26±1 mm). The diameter of the non-growth halo with Ailanthus altissima methanolic extract was 17.5±0.5 mm in Pseudomonas aeruginosa and 16.5±0.5 mm in Staphylococcus aureus, and the effect was significant (P<0.0001). Only Ailanthus altissima hydroalcoholic extract had an effect on Proteus vulgaris. High saponin content of two plants increased their effectiveness.

Conclusion Aqueous extract of Salvia nemorosa is recommended to inhibit the growth and proliferation of Pseudomonas aeruginosa.

* *Corresponding Author:*

Razieh Taghavizad

Address: Department of Biology, Yadegar-e-Imam Khomeini (RAH) Shahre-Rey Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
Tel: +98 (912) 1463575

Extended Abstract

Introduction

Staphylococcus aureus bacteria is responsible for a large number of hospital infections [1]. It has even been proposed as a secondary bacterial infectious agent in the COVID-19 and a cause of death [3]. Pseudomonas aeruginosa bacteria exist in groundwater and swimming pools [5, 6]. it enters plants and foods through the rhizosphere [7]. By contaminating water, it is transferred to cows and their milk and remains even after pasteurization [8]. Proteus vulgaris bacteria is a human pathogen and is isolated from patients with coronary artery disease [9]. Antibiotic resistance of these three bacteria investigated in this research.

Ailanthus altissima is a fast-growing deciduous tree (tree of heaven) from the Simaroubaceae family and grows in almost all regions of Iran [15]. The antibacterial role of Ailanthus altissima leaf extract with the synthesis of zinc oxide nanoparticles on Escherichia coli has been reported [16]. Saponin has antioxidant and antimicrobial properties, and its presence in some medicinal plants has caused it to be used in the manufacture of medicines. This study aims to investigate antiseptic properties of Ailanthus altissima and Salvia nemorosa.

Methods

In this study, two field and laboratory methods were used. In the field method, the plant growth area was visited, samples were collected and their initial preparation was done. In the laboratory method, extracts were obtained from two plants with three different solvents; bacteria were cultivated in a special culture medium; bacteria were treated with the well diffusion method by the extracts, and saponin was extracted from the plants.

The flowering branches of Salvia nemorosa and the leaves of Ailanthus altissima were collected from an area in the south of Karaj and northeast of Mohammadshahr in Karaj, Iran in 2017 and dried in the shade. Bacterial strains were obtained from Iranian Research Organization for Science and Technology.

The extraction was done by Maceration method in the forms of aqueous, methanolic, and hydroalcoholic extract according to the modified method of Azwanida (2015). In Maceration extraction method, 10 grams of the plant was powdered, water was added by 1.5 times and mixed on a shaker. It was passed through Whatman grade 2 filter paper and placed in a rotary machine for 3 hours. In Methanolic method, 10 grams of the plant was powdered. Methanol was added at a ratio of 1:10 and placed on a shaker for 72 hours. Methanol was then added again at a ratio of 1:10 and placed in the rotary machine for 30 minutes. In hydroalcoholic method, 10 grams of the plant was powdered. Methanol and water were then added at a ratio of 80:20 and placed on a shaker for 72 hours. In order to concentrate, it was then placed in the rotary machine for 1 hour.

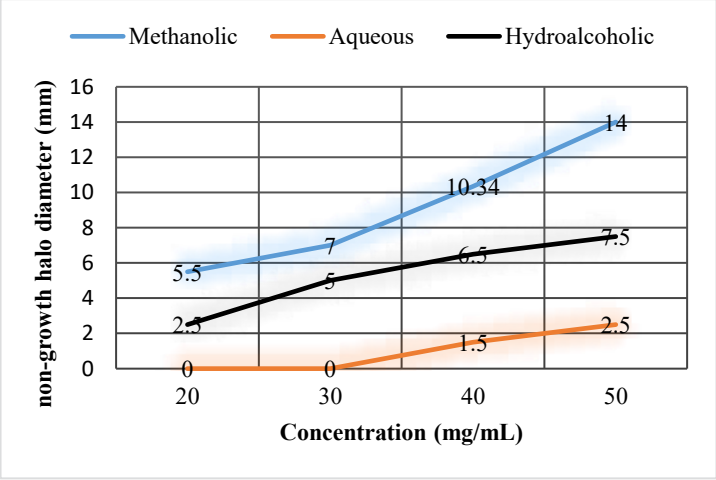
Nutrient Broth culture medium was used as the main stock for maintaining bacteria. To prepare nutrient agar culture medium, 10 grams of culture medium was dissolved in 500 ml of distilled water. It was cultivated in 4 stages and densely. After 24-48 hours of cultivation [23], a suspension was prepared from the colonies. The density of the suspension was compared with 0.5 McFarland Standard. The 0.5 McFarland suspension had an optical absorbance of 0.08-0.1 at the wavelength of 625 nm. Cultivation was done in Mueller-Hinton agar medium according to the modified method of Golus et al. (2016). Diluted extracts with different concentrations (20-30-40 and 50 mg/ml) were prepared in dug wells. Then, 30 mL were poured into the wells and incubated, and their growth or non-growth halos were examined [25].

Saponin was extracted according to the modified method of Zeb et al. (2014). In this method, 20 grams of the plant was powdered and extracted with 20% ethanol in two steps. After concentration, it was mixed with 20 ml of diethyl ether in a separatory funnel. The resulting solution was shaken with 60 ml of normal butane. The extract was treated with 10 ml of 5% sodium chloride and the resulting solution was concentrated and dried.

The tests were repeated three times and the results were analyzed using GraphPad Prism v.7 software.

Results

The increase in concentration of extracts for both plants had a significant relationship with the increase in the diameter of the growth halo ($P<0.0001$). The methanolic extract of Ailanthus altissima with a concentration of 50 mg/ml had the most effect on Staphylococcus aureus bacteria (mean non-growth halo diameter= 16.5±0.5 mm). The effect of maceration extract of Ailanthus altissima leaf on Staphylococcus aureus at concentrations of 50, 40, and 30 mg/ml was higher than that of Salvia nemorosa (Figure 1 and 2). Only the hydroalcoholic extract of Ailanthus altissima had significant effect on Proteus vulgaris (mean non-growth halo diameter= 6.5



Complementary Medicine Journal
Arak University of Medical Sciences

Figure 1. Comparison of the effect of different concentrations of aqueous, methanolic and hydroalcoholic extracts of Salvia nemorosa on creating a non-growth halo in Staphylococcus aureus

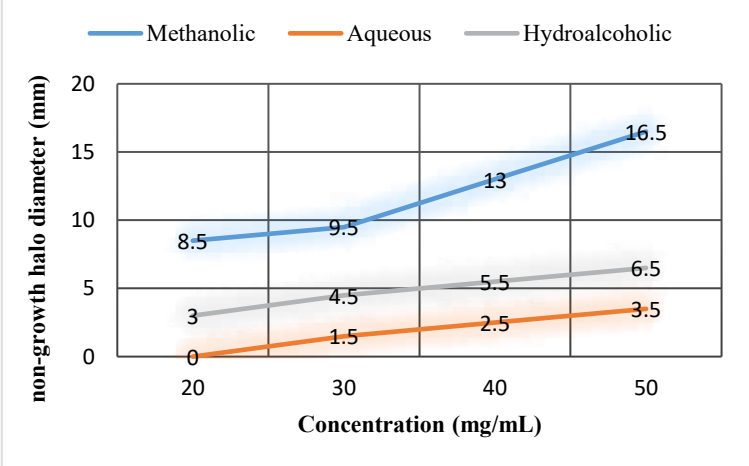
mm), but the Salvia nemorosa extracts had no significant effect (Figure 3). The amount of saponin was high in two plants; it was higher in Salvia nemorosa (28.20±0.15%) than in Ailanthus altissima (24.01±0.10%).

Discussion

Even though the methanolic extract of both Ailanthus altissima and Salvia nemorosa had strong effect on Staphylococcus aureus, but the highest effect and the largest diameter of non-growth halo was related to Ailanthus altissima. Staphylococcus aureus is an opportunistic pathogen with extensive activity in most places; Ailanthus altissima can be used as a good disinfectant to remove this omnipresent bacterium in public places with minimal side effects. But, chlorination is currently used for disinfection of swimming pools, and ultraviolet rays are used in hospitals for disinfection of beds, walls, and floors.

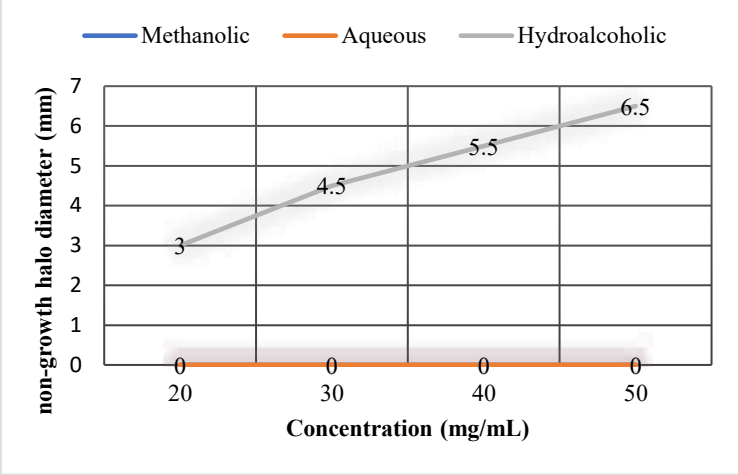
Comparison of the effects of all concentrations of aqueous, alcoholic and hydroalcoholic extracts of Ailanthus altissima on Staphylococcus aureus showed that the largest diameter of non-growth halo was observed after treatment with methanolic extract (16.5±0.5). Poljuhaa et al. also reported the methanolic extract of Ailanthus altissima as a valuable antibacterial source (Escherichia

aureus



Complementary Medicine Journal
Arak University of Medical Sciences

Figure 2. Comparison of the effect of different concentrations of aqueous, methanolic and hydroalcoholic extracts of Ailanthus altissima on creating a non-growth halo in Staphylococcus aureus



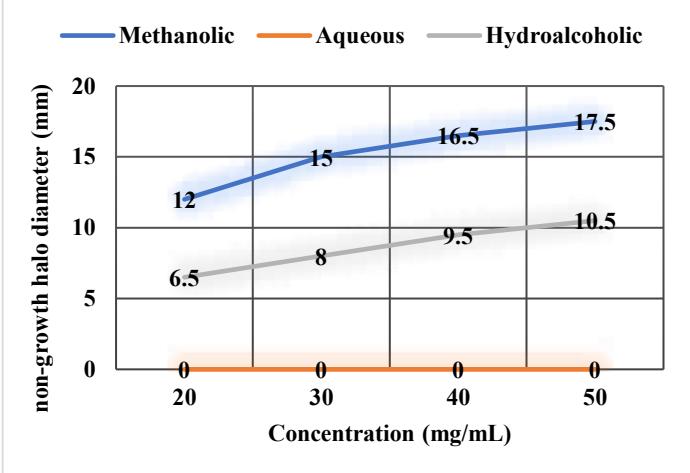
Complementary Medicine Journal
Arak University of Medical Sciences

Figure 3. Comparison of the effect of different concentrations of aqueous, methanolic and hydroalcoholic extracts of Ailanthus altissima on creating a non-growth halo in Proteus vulgaris

coli) and suggested the phenolic and flavonoid compounds such as glycosides and quercetin-3-o-glucoside to be the factors of this characteristic [28].

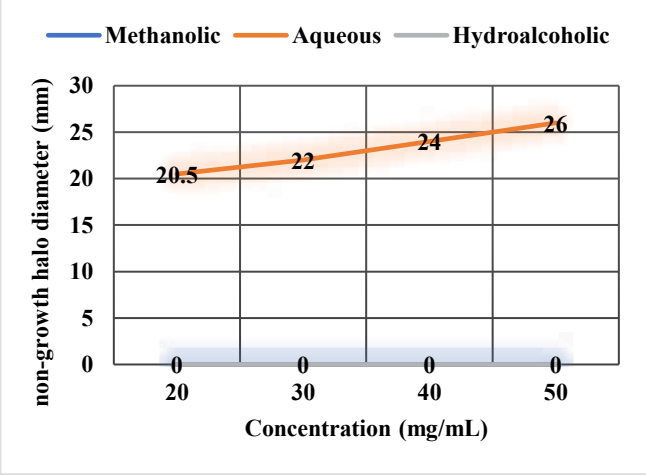
The assessment of the effect of aqueous extract of Ailanthus altissima and Salvia nemorosa on Pseudomonas aeruginosa also showed an interesting result: only Salvia nemorosa had a significant effect in all tests (with a non-growth halo diameter of 26±1 mm). Therefore, regardless of the type of extract (aqueous, alcoholic, hydroalcoholic), the type of plant, in addition to the type of bacteria, plays a role in influencing and inhibiting the growth of bacteria. Ivanov et al. investigated the effect of different solvents for extracting Salvia nemorosa and introduced it as a natural bioactive therapeutic agent with antioxidant, antidiabetic and antimicrobial properties [29].

Methanolic and hydroalcoholic extracts of Ailanthus altissima were more effective on Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus, where the methanolic extract (with non-growth halo diameter of 17.5±0.5 mm) was higher effect. Ailanthus altissima hydroalcoholic extract was effective against Proteus vulgaris and had an antimicrobial effect. Al-Snafi also reported that the Ailanthus altissima plant is capable of destroying bacteria that are resistant to several drugs [30] (Figure 4 and 5).



Complementary Medicine Journal
Arak University of Medical Sciences

Figure 4. Comparison of the effect of different concentrations of aqueous, methanolic and hydroalcoholic extracts of Ailanthus altissima on creating a non-growth halo in Pseudomonas aeruginosa



Complementary Medicine Journal
Arak University of Medical Sciences

Figure 5. Comparison of the effect of different concentrations of aqueous, methanolic and hydroalcoholic extracts of Salvia nemorosa on creating a non-growth halo in Pseudomonas aeruginosa

The saponin amount in Ailanthus altissima plant was 24.01±0.10% while it was 28.20±0.15% in Salvia nemorosa plant. In Chenopodium quinoa, saponin amount is 2.03±0.29% and in Launaea sarmentosa, which is an anti-cancer drug, it is 10.80% [32]. The high amount of saponin in the study plants is undoubtedly one of the most important reasons for their antimicrobial properties. The extracts of two plants can be used to disinfect hospital equipment surfaces, swimming pools, and milking equipment in livestock farms where the three Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, and Proteus vulgaris bacteria are found.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

There were no ethical considerations to be considered in this research.

Funding

This study was extracted from the MA. thesis of the first author in Yadegar-e-Imam Khomeini Yadegar emam Branch, Islamic Azad University.

Authors' contributions

The corresponding author had the most contributions, then the first and afterward the third author to preparing this article.

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors would like to thank Yadegar-e-Imam Khomeini Shahre Rey Branch, Islamic Azad University for their financial support, and Dr. Falsafi and the staff of the laboratory in Yadegar-e-Imam Khomeini Shahre Rey Branch (Khosravi and Etemadi) for their cooperation.

مقاله پژوهشی

مقایسه اثرات ضد باکتریایی عصاره گیاهان عرعر و مریم گلی مزرعه روی بر سودوموناس آئروژینوزا، استافیلوکوکوس اورئوس و پروتئوس ولگاریس در شرایط درشیشه

سپیده فرازنده[۱]، *راضیه تقوی‌زاد[۱]، شیوا خلیل‌مقدم[۱]

۱. گروه زیست‌شناسی، واحد یادگار امام خمینی (ره)شهر ری، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

اطلاعات مقاله:
تاریخ دریافت: ۲۳تیر ۱۴۰۰
تاریخ پذیرش: ۱۷بهمن ۱۴۰۰
تاریخ انتشار: ۱۲ فروردین ۱۴۰۱

چکیده

هدف برخی گیاهان دارای نقش‌های ضدعفونی‌کننده و اغلب بدون عارضه بر انسان و حیوان هستند. در این تحقیق سعی داریم گیاهانی را برای ضدعفونی فضاها و سطوح آلوده به باکتری‌ها به صورتی که ماده سمی در محیط باقی نماند، معرفی کنیم.

روش‌ها باکتری‌های لیوفیلیزه سودوموناس آئروژینوزا، استافیلوکوکوس اورئوس و پروتئوس ولگاریس تهیه شدند و از عصاره‌های عرعر و مریم‌گلی مزرعه‌روی در شرایط در شیشه استفاده شد. برگ عرعر و سرشاخه گلدار مریم‌گلی جمع‌آوری و در سایه خشک و پودر شدند. عصاره‌های آبی، هیدروالکلی و متانولی به‌طور جداگانه از گیاهان به روش ماسراسیون تهیه شدند. پس از تبخیر حلّال و خشک شدن عصاره، از چهار غلظت ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در محیط کشت مولر هینتون آگار به روش چاهک استفاده شد. استخراج ساپونین با اتانول ۲۰ درصد انجام شد. نتایج آماری با نرم‌افزار گراف پد پریسم، نسخه ۷ بررسی شدند.

یافته‌ها عصاره آبی مریم‌گلی مزرعه‌روی بر سودوموناس آئروژینوزا مؤثر بود و بهترین نتیجه را داد (با قطر هاله عدم رشد۱±۲۶ میلی‌متر). قطر هاله عدم رشد با عصاره متانولی عرعر برای سودوموناس ائروژینوزا ۰/۵±۱۷/۵میلی متر و برای استافیلوکوکوس اورئوس ۰/۵±۱۶/۵میلی‌متر و معنی‌دار بودند (p<۰/۰۰۱). تنها عصاره هیدروالکلی عرعر بر پروتئوس ولگاریس تأثیر داشت. عصاره‌های مریم‌گلی مزرعه‌روی بر پروتئوس ولگاریس بی‌اثر بود. داشتن ساپونین زیاد ۲گیاه اثر بخشی را افزایش داده است.

نتیجه‌گیری برای ممانعت از رشد و تکثیر سودوموناس آئروژینوزا عصاره آبی مریم‌گلی مزرعه‌روی توصیه می‌شود.

کلیدواژه‌ها:
ضدعفونی، عرعر، عصاره آبی، مریم گلی مزرعه روی

مقدمه

باکتری استافیلوکوکوس اورئوس[۱] مسئول اصلی شمار زیادی از عفونت‌های بیمارستانی است و به‌عنوان تهدیدی برای سلامت عمومی شناخته می‌شود [۱]. در محیط کار دندان‌پزشکی در دانشگاه علوم‌پزشکی مشهد تقریباً تمام سطوح نسبت به استافیلوکوکوس اورئوس آلودگی میکروبی نشان دادند. بنابراین این محیط‌ها نیازمند ارتقای سطح کنترل عفونت هستند [۲]. استافیلوکوکوس اورئوس حتی به‌عنوان یک عامل عفونت‌زای ثانوی باکتریایی به‌دنبال همه‌گیری ویروسی با کرونا، مطرح شده و عامل مرگ‌ومیر اعلام شده است [۳].

باکتری سودوموناس آئروژینوزا[۲] علت اصلی عفونت‌های بیمارستانی است [۴]. آب‌های زیرزمینی به‌واسطه نشت فاضلاب آلوده شده و عدم فیلتراسیون آب‌های سطحی باعث گسترش سودوموناس آئروژینوزا می‌شود، همچنین این باکتری در آب‌سردکن‌های بیمارستان‌های شهر تهران دیده شده است [۵]. سودوموناس در استخر شنای کرمانشاه مشاهده شده است [۶]. این باکتری همچنین از طریق خاک و ریزوسفر به گیاهان منتقل و در غذاهایی مانند سالاد وارد می‌شود [۷]. سودوموناس آئروژینوزا با آب آلوده به گاوها منتقل و سبب ورم پستان گاوها می‌شود. این باکتری حتی در شیر پاستوریزه‌شده باقی می‌ماند و باعث تخریب چربی شیر و محصولات لبنی می‌شود. باکتری سودوموناس آئروژینوزا، در محیط دامداری‌ها از طریق مخازن آب و وسایل شیردوشی انتقال می‌یابد [۸].

1. Staphylococcus aureus

2. Pseudomonas aeruginos

* نویسنده مسئول:
راضیه تقوی‌زاد
نشانی: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد یادگار امام خمینی (ره) شهرری، گروه زیست‌شناسی.
تلفن: 1463575 (912) 98+
پست الکترونیکی: ra_taghavizad@yahoo.com

باکتری پروتئوس ولگاریس[3] از پاتوژن‌های انسانی است و از بیمارانی با خطر عروق کرونر جدا شده است. این باکتری در محیط نمکی و با Ph=9 بیشترین بازده پروتئین را دارد [۹].

مقاومت آنتی‌بیوتیکی در هر سه باکتری موردتحقیق این پژوهش دیده شده و این ویژگی بیش‌ازپیش مبارزه با آن‌ها را سخت‌تر کرده است. سودوموناس آوروژینوزا با سه روش آلودگی ایجاد می‌کند: تولید بیوفیلم، مقاومت دارویی و مقاومت آنتی‌بیوتیکی. برخی از این مقاومت‌ها مبتنی بر جهش، سازگاری، تشکیل سلول‌های پایدار، تولید کلنی‌های کوچک، تولید کلنی‌های فونیکس و بیوفیلم است [۱۰]. مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ۴۲ سویه از سودوموناس آوروژینوزا از بخش مراقبت‌های ویژه یک بیمارستان به دست آمد [۱۱]. آن‌ها فاژدرمانی را به‌عنوان راه‌حل پیشنهاد دادند، ولی ممکن است با جهش‌های فاژی، فاژ خود معضل جدیدی به شمار آید.

باکتری استافیلوکوکوس اورئوس به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم است. در یک پژوهش ۱۷۴ سویه به روش واکنش زنجیره ای پلیمراز[4] PCR مورد بررسی قرار گرفتند. تمامی سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاومت آنتی‌بیوتیکی به متی‌سیلین نشان دادند [۱۲].

ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در پروتئوس ولگاریس از بیمارستانی در اسلام آباد پاکستان جدا شد [۱۳]. این باکتری همچنین به سفازولین و سفوروکسیم مقاوم است [۱۴]. بنابراین باید جایگزینی مطمئن برای مقابله با باکتری‌ها به‌جای آنتی‌بیوتیک، که از خود آلودگی به‌جای نگذارد، یافت.

یکی از گیاهان این پژوهش، عرعر یا آسماندار[5]، از تیره Sima-roubaceae با رشد سریع است و تقریباً در همه مناطق ایران می‌روید [۱۵]. نقش ضدباکتریایی عصاره عرعر با سنتز نانوذرات اکسید روی آن بر اشرشیاکلی گزارش شده است [۱۶].

گیاه دیگر این پژوهش مریم‌گلی مزرعه‌روی[6] از تیره نعنائیان[7] و علف هرز اختصاصی مزارع یونجه و بومی ایران است [۱۵]. این گونه یکی از ۵۰ گونه مریم‌گلی در ایران است. متابولیت‌های ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی اسانس مریم‌گلی مزرعه‌روی در نقاط مختلف ایران سنجیده شده است [۱۷].

باکتری‌های این پژوهش پیشینه نابودی یا کم شدن فعالیت در اثر استفاده از عصاره گیاهان دارویی را دارند. طی بررسی‌ها، استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینورا با عصاره‌های گیاهی تأثیرپذیر شده و فعالیتشان قطع شده یا کاهش یافته است. به‌طوری که عصاره کامل گیاه آلوئه‌ورا اثرات ضدمیکروبی خوبی بر استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، استافیلوکوکوس اورئوس، کلبسیلا پنومونیه و اشرشیاکلی نشان داده است. عصاره آبی آلوئه‌ورا در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های رایج روی باکتری‌های عفونت‌زا اثر مشابهی دارد [۱۸]. عصاره متانولی و اتانولی برگ ازگیل فعالیت ضدباکتریایی قوی‌ای بر سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس دارد [۱۹].

ساپونین یک ترکیب ضدعفونی‌کننده طبیعی موجود در برخی از گیاهان دارویی

در کنار عوامل بیماری‌زایی که از هرسو در محیط زندگی، ما را تهدید می‌کنند گیاهانی با خاصیت‌های معجزه‌گر وجود دارند که باید از آن‌ها بهره برد. برای مثال ساپونین که مانند صابون دارای خاصیت کف‌کنندگی است، در برخی از گیاهان وجود دارد و نقش ضدعفونی‌کننده دارد که در این تحقیق نیز بررسی و به میزان زیادی یافت شده است. ساپونین دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی است و وجودش در برخی ازگیاهان دارویی سبب شده تا در ساخت داروها کاربرد داشته باشد [۲۰].

امروزه بسیاری از مواد ضدعفونی‌کننده با وجودی که درصد کشندگی میکروب بالایی دارند، ولی اثرات نامطلوب بر انسان، از پوست گرفته تا ریه، می‌گذارند. در این تحقیق سعی شده است گیاهانی با اثر ضدعفونی‌کنندگی خوب و در عین حال بدون داشتن بوی نامطبوع و حتی مطبوع و خوشایند و بدون به‌جا گذاشتن سموم و اثرات نامطلوب بر سلامتی انسان و محیط‌زیست معرفی شوند. در این تحقیق خواص ضدعفونی مریم‌گلی مزرعه‌روی و عرعر را برای اولین بار در ایران انجام دادیم.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش، دو روش میدانی و آزمایشگاهی به کار رفت. در روش میدانی، مراجعه به منطقه رویش گیاهان، جمع‌آوری نمونه‌ها و آماده‌سازی اولیه آن‌ها صورت گرفت. در روش آزمایشگاهی، مراحل عصاره‌گیری از ۲ گیاه با ۳ حلال مختلف، کشت باکتری‌ها در محیط کشت اختصاصی، تیمار باکتری با روش انتشار چاهک با عصاره‌ها و استخراج ساپونین از گیاهان انجام شد.

روش میدانی

گیاهان مریم‌گلی مزرعه‌روی و عرعر از منطقه‌ای در جنوب کرج و شمال شرقی محمدشهر کرج در سال ۱۳۹۷ جمع‌آوری شدند. سرشاخه گل‌دار مریم‌گلی مزرعه‌روی در اردیبهشت ماه بعد از گل دادن بریده و در سایه خشک شد. برگ‌های عرعر هم در خرداد ماه قطع و در سایه خشک شد. گل‌های خشک‌شده مریم‌گلی مزرعه‌روی و برگ‌های عرعر تا زمان استفاده برای عصاره‌گیری در کیسه‌های پلاستیکی جداگانه و در بسته‌ای در جای خشک و خنک و دور از آفتاب نگه‌داری شدند.

3. Proteus vulgaris
4. Polymerase Chain Reaction
5. Ailanthus altissima
6. Salvia nemorosa
7. Lamiaceae

تهیه سوش‌های باکتریایی

سوش‌های باکتریایی استافیلوکوکوس اورئوس (PTCC No 1189)، سودوموناس آئروژینوزا (PTCC No 1430)، پروتئوس ولگاریس (PTCC No1079)، از مؤسسه تحقیقات علوم و تکنولوژی ایران[8] تهیه شد.

روش آزمایشگاهی

عصاره‌گیری به روش ماسراسیون و خیساندن

در این تحقیق از روش آزوانیدا[9] (۲۰۱۵) با کمی تغییر استفاده شد. ۱۰ گرم گیاه پودرشده و ۱/۵ برابر آن آب، ۴۸ ساعت روی شیکر مخلوط شد. سپس از کاغذ صافی واتمن شماره ۲ عبور داده شد و در دستگاه روتاری ۳ ساعت قرار داده شد. عصاره غلیظی حاصل شد که در دسیکاتور کاملاً خشک شد و تا زمان اثردهی در یخچال نگهداری شد [۲۱].

عصاره‌گیری متانولی

از روش آزوانیدا (۲۰۱۵) با کمی تغییر استفاده شد. ۱۰ گرم گیاه پودر شد. به نسبت ۱:۱۰ متانول افزوده شد و ۷۲ ساعت روی شیکر قرار داده شد و هر ۲۴ ساعت یک بار از کاغذ صافی عبور داده شد و مجدداً به نسبت ۱:۱۰ متانول افزوده شد. سپس ۳۰ دقیقه در دستگاه روتاری قرار داده شد. عصاره غلیظی که از روتاری ایجاد شد در دسیکاتور قرار داده شد تا عصاره خشکی حاصل شود. عصاره خشک تا زمان اثردهی در یخچال نگهداری شد [۲۱].

عصاره‌گیری هیدروالکلی

از روش آزوانیدا (۲۰۱۵) با کمی تغییر استفاده شد. ۱۰ گرم گیاه پودر شد. نسبت ۸۰:۲۰ از متانول و آب تهیه شد و ۷۲ ساعت روی شیکر قرار داده شد. هر۲۴ ساعت یک بار از کاغذ صافی عبور داده شد و مجدداً متانول و آب افزوده شد. به‌منظور تغلیظ ۱ ساعت در دستگاه روتاری قرار داده شد و برای خشک شدن کامل در دسیکاتور قرار داده شد. عصاره خشک حاصل تا زمان اثردهی در یخچال نگه داری شد [۲۱].

تهیه محیط کشت نوترینت براث

بعد از باز کردن آمپول لیوفیلیزه، ۱۰ گرم محیط کشت نوترینت آگار در ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حرارت داده شد تا به جوش بیاید و با دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد استریل شد. سپس درون ارلن‌های کوچک‌تر ۲۰ میلی‌لیتری ریخته شد و بدین‌ترتیب از محیط کشت نوترینت براث ساخته‌شده به‌عنوان استوک اصلی برای نگهداری باکتری استفاده شد [۲۲].

محیط کشت نوترینت آگار

۱۰ گرم از محیط کشت در ۵۰۰ میلی‌لیتر آب‌مقطر حل شد. باکتری به‌صورت ۴ مرحله‌ای و متراکم براساس روش‌های متداول میکروبیولوژی کشت داده شد. بعد از ۲۴ تا ۴۸ ساعت کشت [۲۳] از کلنی‌ها سوسپانسیون تهیه شد. کدروت سوسپانسیون با نیم‌مک‌فارلند مقایسه شد.

نیم‌مک‌فارلند و کشت مولر هینتون آگار

استاندارد نیم‌مک‌فارلند با رسوب باریوم سولفات تهیه شد [۲۴]. سوسپانسیون نیم‌مک‌فارلند در طول موج ۶۲۵ نانومتر جذب نوری ۰/۱-۰/۰۸ داشت. در این آزمایش از روش چشمی نیز استفاده شد و مقایسه کدورت نتیجه یکسان داشت. محیط کشت مولر هینتون آگار از نوع مرک آلمان بود.

کشت در محیط کشت مولر هینتون آگار

از روش گولوس[10] و همکاران (۲۰۱۶) با کمی تغییر استفاده شد. این کار به روش چاهک انجام شد. روی محیط کشت مولر هینتون آگار چاهک کنده شد و عصاره‌های خشک‌شده با غلظت‌های مختلف (۲۰، ۳۰، ۴۰ و۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) تهیه شد و ۳۰ میکرولیتر در چاهک‌ها ریخته شد. عصاره‌ها ۲۴ الی۴۸ ساعت در آون انکوبه شدند و هاله رشد و یا عدم رشد آن‌ها بررسی شد [۲۵].

استخراج ساپونین

۲۰ گرم از گیاه پودر شده و ۴ ساعت در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد با ۱۰۰ میلی‌لیتر از اتانول ۲۰ درصد قرار گرفت. عصاره صاف شد و ته‌نشست باقی مانده مجدداً با ۲۰۰ میلی‌لیتر اتانل ۲۰ درصد عصاره‌گیری شد. عصاره در حمام آبی تغلیظ شد. سپس با ۲۰ میلی‌لیتر دی اتیل اتر در یک قیف جداکننده مخلوط شد. مخلوط به‌شدت شیک شد. سپس محلول آبی جمع‌آوری شد. به لایه آبکی ۶۰ میلی‌لیتر بوتان نرمال افزوده شد و به‌خوبی با شیکر قوی مخلوط شد. عصاره بوتانل نرمال با ۱۰ میلی‌لیتر محلول کلرید سدیم ۵ درصد تیمار شد. محلول حاصل در یک حمام آبی تغلیظ شد و ساپونین‌های خام در یک آون خشک شدند [۲۶].

بررسی آماری

همه آزمون‌ها با ۳ تکرار انجام شد و نتایج آماری با نرم‌افزار گراف پد پریسم نسخه ۷ بررسی شد.

8. Iranian Research Organization for Science and Technology
9. Azwanida
10. Golus

یافته‌ها

اثر عصاره هیدروالکلی گیاهان مریم‌گلی مزرعه روی و عرعر بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس نشان داد افزایش غلظت با افزایش قطر هاله عدم رشد در هردو معنی‌دار است (P< ۰/۰۰۰۱) (جدول شماره ۱).

مقایسه اثر عصاره هیدروالکلی دو گیاه عرعر و مریم‌گلی مزرعه‌روی بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس نشان داد عصاره متانلی گیاه عرعر با غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بیشترین اثر را داشته است (با هاله عدم رشد ۱۶/۵ ±۰/۵ میلی‌متر). به طور کلی افزایش غلظت با افزایش هاله عدم رشد در هر دو گیاه و تمام غلظت‌ها معنی‌دار است (جدول شماره ۱).

مقایسه اثر عصاره آبی دو گیاه عرعر و مریم‌گلی مزرعه روی بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس نشان داد تأثیر عصاره آبی از گیاه عرعر در غلظت‌های ۵۰ و ۴۰ و ۳۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بیشتر از مریم‌گلی بوده است (جدول شماره ۱ و تصویرهای شماره ۱ و ۲).

مقایسه عصاره‌های دو گیاه بر پروتئوس ولگاریس نشان داد تنها عصاره هیدروالکلی عرعر تأثیرگذار بوده است (با هاله عدم رشد میانگین ۶/۵ میلی‌متر) در حالی که عصاره‌های مریم‌گلی مزرعه‌روی بی‌تأثیر بوده‌اند (تصویرهای شماره ۳ و ۴).

اندازه‌گیری مقادیر ساپونین در دو گیاه موردبررسی این پژوهش در جدول شماره ۲ نشان داده شده است. مقایسه مقادیر حاکی از مقدار بیشتر ساپونین (۰/۱۵±۲۸/۲۰ درصد) در گیاه مریم‌گلی مزرعه‌روی است.

از میان عصاره‌های مختلف مریم‌گلی تنها عصاره آبی آن بر سودوموناس آئروژینوزا مؤثر بود با معنی‌داری P<۰/۰۰۰۱. درحالی‌که از میان عصاره‌های مختلف عرعر، عصاره آبی هیچ تأثیری نداشته، ولی به ترتیب اول عصاره متانولی و سپس هیدروالکلی بیشترین تأثیر را داشته‌اند (تصویرهای شماره ۵ و ۶).

جدول ۱. اثر عصاره‌های متانولی، آبی و هیدروالکلی گیاهان مریم گلی مزرعه‌روی و عرعر با غلظت‌های مختلف بر استافیلوکوکوس اورئوس و میانگین اندازه قطر هاله عدم رشد آن

تیمار عصاره‌های مریم‌گلی مزرعه‌روی بر استافیلوکوکوس اورئوس					
	غلظت‌ها (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)		۲۰	۳۰	۴۰	۵۰
میانگین قطر هاله عدم رشد (mm)		متانولی	۵/۵±۰/۵	۷±۱	۱۰/۳۳±۱/۵	۱۴±۱
		آبی	———	———	۱/۵ ±۰/۵	۲/۵ ±۰/۵
		هیدروالکلی	۲/۵ ±۰/۵	۵±۱	۶/۵ ±۰/۵	۷/۵ ±۰/۵

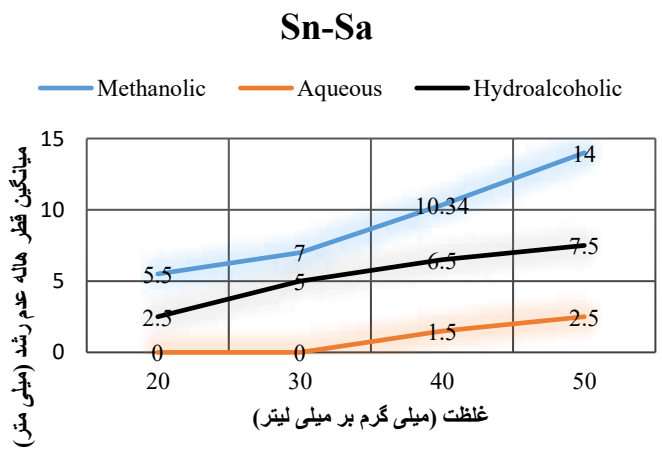
تیمار عصاره‌های عرعر بر استافیلوکوک اورئوس					
		میانگین±انحراف معیار			
	غلظت‌ها (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)		۲۰	۳۰	۴۰	۵۰
میانگین قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر)		متانولی	۸/۵ ±۰/۵	۹/۵± ۰/۵	۱۳±۲	۱۶/۵ ±۰/۵
		آبی	———	۱/۵±۰/۵	۲/۵ ±۰/۵	۳/۵ ±۰/۵
		هیدروالکلی	۳±۱	۴/۵ ±۰/۵	۵/۵ ±۰/۵	۶/۵ ±۰/۵

مجله طب مکمل
دانشگاه علوم پزشکی اراک

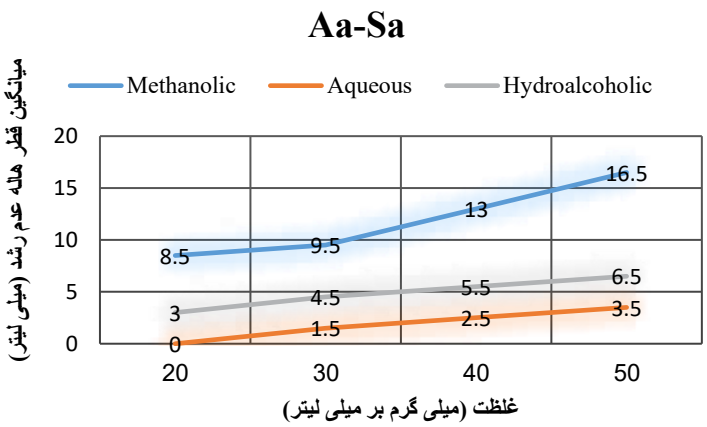
جدول ۲. مقایسه مقادیر میانگین ساپونین در ۲ گیاه موردسنجش این پژوهش

گیاه موردسنجش	مقدار میانگین±انحراف‌معیار ساپونین (درصد)
مریم‌گلی مزرعه‌روی	۲۸/۲۰±۰/۱۵
عرعر	۲۴/۰۱±۰/۱۰

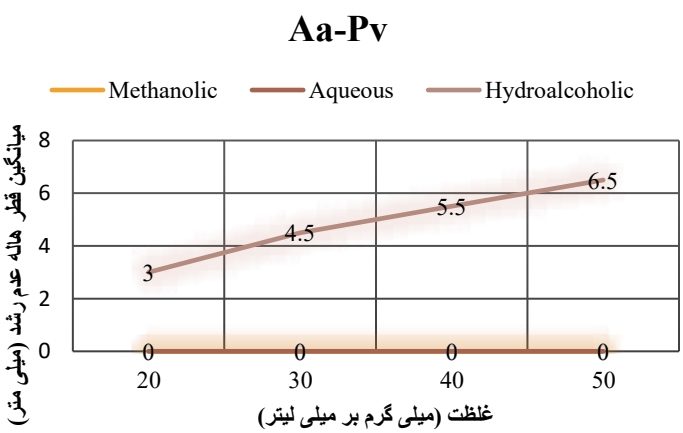
مجله طب مکمل
دانشگاه علوم پزشکی اراک



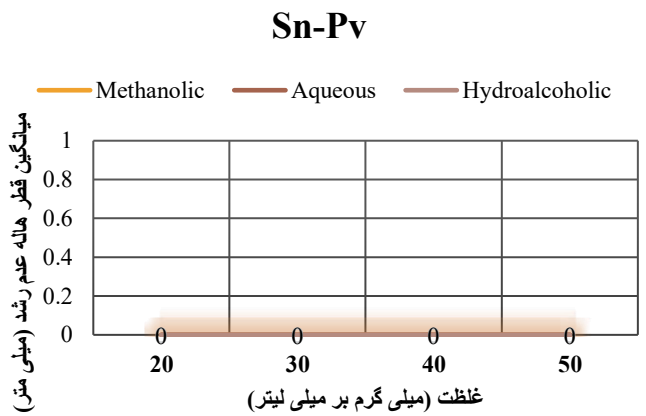
تصویر ۱. مقایسه اثر غلظت‌های مختلف عصاره‌های آبی، الکلی و هیدروالکلی گیاه مریم‌گلی بر استافیلوکوکوس اورئوس در ایجاد هاله عدم رشد



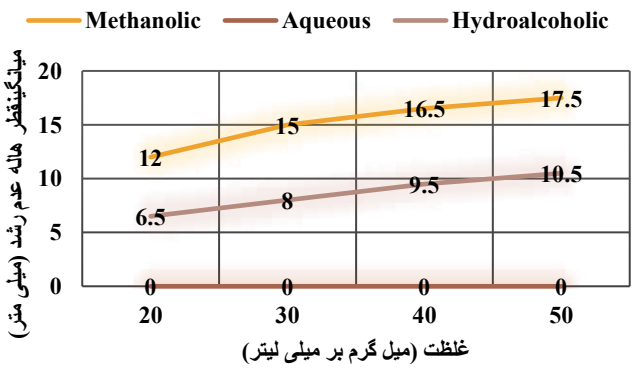
تصویر ۲. مقایسه اثر غلظت‌های مختلف عصاره‌های آبی، الکلی و هیدروالکلی گیاه عرعر بر استافیلوکوکوس اورئوس در ایجاد هاله عدم رشد



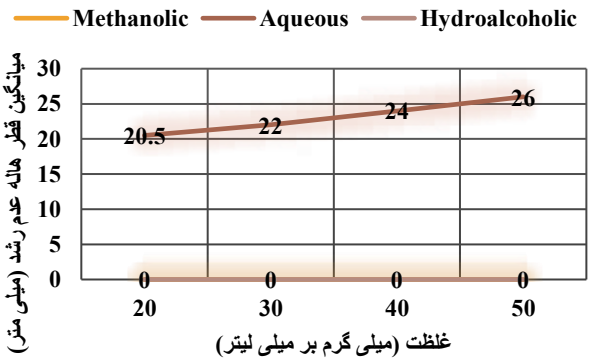
تصویر ۳. مقایسه اثر تمامی غلظت‌های عصاره‌های متانولی، آبی و هیدروالکلی عرعر بر پروتئوس ولگاریس



تصویر ۴. مقایسه اثر تمامی غلظت‌های عصاره‌های متانولی، آبی و هیدروالکلی مریم‌گلی بر پروتئوس ولگاریس



تصویر ۵. مقایسه اثر تمامی غلظت‌های عصاره‌های آبی، الکلی و هیدروالکلی عرعر بر سودوموناس آئروژینوزا



تصویر ۶. مقایسه اثر تمامی غلظت‌های عصاره‌های آبی، الکلی و هیدروالکلی مریم‌گلی مزرعه‌روی بر سودوموناس آئروژینوزا

بحث

مقایسه‌ها نشان داد با وجودی که عصاره متانولی هر دو گیاه عرعر و مریم‌گلی مزرعه روی بر استافیلوکوکوس اورئوس به‌طور قوی عمل می‌کنند، ولی بهترین پاسخ و بیشترین قطر هاله عدم رشد، مربوط به تیمار با عرعر بوده است و افزایش غلظت عصاره همیشه با افزایش قطر هاله عدم رشد باکتری‌ها معنی‌دار بود (P<۰/۰۰۰۱)، یعنی می‌توان غلظت‌های بیشتر را هم اعمال کرد.

استافیلوکوکوس اورئوس یک باکتری فرصت‌طلب با فعالیت وسیع در اکثر فضاها و اماکن است. بنابراین عرعر می‌تواند به‌عنوان یک ضدعفونی‌کننده خوب برای زدودن این باکتری همه‌جازی در اماکن عمومی مصرف شود. آن‌هم با حداقل عوارض، این در حالی است که اکنون برای استخرها از کلرزنی و برای سطوح بیمارستانی، مانند تخت و دیوار و کف از اشعه ماورای بنفش استفاده می‌شود. تحقیقات نشان داده گاه با وجود به‌کارگیری مواد شیمیایی قوی همچنان میکروب‌ها مقاومت نشان می‌دهند به‌طوری‌که در تحقیق یوسفی و همکاران در استخر شهر ساری حتی با وجود کلرزنی، ۲۹/۳ درصد استافیلوکوکوس اورئوس در محیط گزارش شده است [۲۷].

مقایسه اثر تمامی غلظت‌های عصاره‌های آبی، الکلی و هیدروالکلی گیاه عرعر بر استافیلوکوکوس اورئوس نشان داد بیشترین قطر هاله عدم رشد مربوط به عصاره متانولی بوده است (۰/۵ ± ۱۶/۵). پولی‌یوها[11] و همکاران نیز در تحقیقات خود عصاره متانولی عرعر را یک منبع ارزشمند ضدباکتریایی (اشرشیاکلی) معرفی کردند و ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی، مانند گلیکوزیدها و کوئرستین - o - 3- گلوکوزید را عوامل این خصوصیت دانسته‌اند [۲۸]. گاه عصاره آبی مؤثرتر از سایر عصاره‌هاست یا اثرگذاری آن نزدیک به سایر عصاره هاست.

تأثیر عصاره آبی عرعر و مریم‌گلی مزرعه‌روی بر سودوموناس آئروژینوزا نتیجه جالبی را نشان داد. با وجودی که هر دو عصاره بر یک نوع باکتری اثر داده شدند، ولی فقط مریم‌گلی مزرعه‌روی تأثیر داشته، آن‌هم با بیشترین تأثیر در کل این سنجش‌ها (با هاله عدم رشد ۱±۲۶ میلی‌متر) (تصویرهای شماره ۵ و ۶). بنابراین صرف‌نظر از نوع عصاره (آبی یا غیره) نوع گیاه هم علاوه بر نوع باکتری در تأثیرپذیری و ممانعت از رشد باکتری نقش دارد. در این راستا ایوانو[12] و همکاران اثر حلال‌های استخراج مختلف مریم‌گلی مزرعه‌روی را بررسی کرده و این گیاه را به‌عنوان یک عامل درمانی فعال زیستی طبیعی با کاربردهای آنتی‌اکسیدانی، ضددیابتی و ضدمیکروبی معرفی کردند [۲۹].

عصاره آبی مریم‌گلی مزرعه‌روی در غلظت‌های ۲۰ و ۳۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر استافیلوکوکوس اورئوس اصلاً ایجاد هاله نمی‌کرد (جدول شماره ۱)، ولی این سبب نمی‌شود تا به یقین بگوییم همیشه عصاره‌های الکلی مؤثرتر از عصاره‌های آبی هستند. به‌طوری‌که از بین عصاره‌ها تنها عصاره آبی مریم‌گلی مزرعه‌روی بر سودوموناس آئروژینوزا ایجاد هاله می‌کرد (تصویر شماره ۶). به‌هرحال ذکر این نکته ضرورت دارد که حلال‌های استفاده‌شده در این پژوهش تماماً تبخیر شدند و در طی فرآوری عصاره خشک‌شده مصرف شد و مجدداً موقع مصرف با آب رقیق‌سازی شد. بنابراین حتی حلال‌های الکلی یا هیدروالکلی به جهت تبخیر کامل، عصاره را مضر نمی‌کنند.

نتایج این پژوهش می‌تواند استفاده آسان‌تر، بی‌ضرر و به‌صرفه‌تری از این عصاره‌ها را برای مصارف اماکن عمومی امکان‌پذیر کند. عرعر به‌وفور در مناطق مختلف فضاهای سبز به‌صورت یک گیاه مهاجم درآمده و بهره‌برداری از آن می‌تواند نقش دوگانه ایفا کند. مریم‌گلی مزرعه‌روی هم در بیشتر مناطقی که یونجه کشت می‌شود به‌صورت یک علف هرز مزرعه می‌روید و هردو گیاه قابلیت دسترسی خوبی دارند.

عصاره‌های متانولی و هیدروالکلی

عصاره‌های متانولی و هیدروالکلی عرعر بر سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس بیشتر تاثیرگذار بودند، با ارجحیت عصاره متانولی (با هاله عدم رشد ۰/۵ ± ۱۷/۵ میلی‌متر) (تصویرهای شماره ۳ و ۶).

نتیجه‌بخش بودن عصاره‌های هیدروالکلی و آبی در این پژوهش از ارزش زیادی برخوردار است، چون غالباً کمتر عصاره یا حتی مواد شیمیایی کم‌خطری قادر به از بین بردن یا مهار باکتری‌هاست. در این تحقیق عصاره هیدروالکلی عرعر بر پروتئوس ولگاریس مؤثر و اثر ضد میکروبی از خود نشان داده است. در این راستا الاسنافی[13] اعلام کرد گیاه عرعر قادر به از بین بردن باکتری‌هایی است که مقاومت به چندین دارو[14] را کسب کرده‌اند [۳۰].

ساپونین

ساپونین‌ها علاوه بر آنکه برای خود گیاه در سیستم دفاعی در برابر حملات مهاجمان شرکت دارند، کاربرد وسیعی در تولید داروهای گیاهی و صنعت داروسازی دارند. به‌طوری‌که در ساخت هورمون‌های استروئیدی، داروهای ضدالتهاب و ایمنی بدن به کار می‌روند [۲۰].

11. Poljuhaa
12. Ivanov
13. Al-snafi
14. Multi-drug resistant bacteria

در پژوهش حاضر، نتایج استخراج ساپونین نشان داد؛ ساپونین موجود در گیاه عرعر ۰/۱۰ ۲۴/۰۱ درصد و در گیاه مریم‌گلی مزرعه‌روی ۰/۱۵±۲۸/۲۰ درصد بوده است. میزان زیاد ساپونین در گیاهان موردبررسی می‌تواند نشان‌دهنده خصوصیت ضدعفونی این گیاهان باشد و بی‌شک یکی از مهم‌ترین دلایل اثر ضدمیکروبی گیاهان این پژوهش داشتن ساپونین زیادشان است. درحالی‌که این ماده ضدعفونی‌کننده در بسیاری از گیاهانی که به داشتن ساپونین معروف‌اند، بسیار کمتر از مقادیر این پژوهش است. به‌طوری‌که دانه مغذی کینوآ[15]، نوعی سلمک، که سرخپوستان از آن استفاده می‌کنند، ۰/۲۹±۲/۰۳ درصد ساپونین دارد [۳۱] و برگ گیاهی از تیره آفتابگردان به نام Launaea sarmentosa که داروی ضدسرطان است و در ویتنام مصرف زیاد دارد میزان ساپونینش ۱۰/۸۰ درصد است [۳۲].

از ویژگی‌های این پژوهش آن است که با وجودی که درباره اثر ضدمیکروبی گونه‌های مختلف سالویا بر استافیلوکوکوس اورئوس کار شده، ولی درباره گونه بومی ایران که S. bracteata است تحقیق نشده و نیز سایر گونه‌ها تأثیری در حد پژوهش ما نداشته‌اند. به‌طوری‌که مصلح آرانی[16] و همکاران بیشترین پاسخ را برای گونه S.bracteata با هاله عدم رشد ۹ میلی‌متر گزارش کرده‌اند [۳۳].

نتیجه‌گیری

از نتایج این تحقیق می‌توان در مواردی، مانند سطوح بیمارستانی و استخرهای شنا که معمولاً سه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس، پروتئوس ولگاریس و سودوموناس آئروژینوزا در آن‌ها دیده شده برای ضدعفونی استفاده کرد. در استخرهای شنا معمولاً از کلرزنی استفاده می‌شود که دُز مصرف آن رعایت نمی‌شود و باعث رنگ‌بری مو و آسیب به پوست و چشم می‌شود و در سطوح بیمارستانی معمولاً از ساولن یا آب‌ژاول استفاده می‌شود که غالباً بدبوست و برای ریه ناراحت‌کننده است. درحالی‌که عصاره‌های گیاهی این پژوهش، مطبوع برای تنفس بدون عوارض هستند.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

در این پژوهش، تمامی اصول اخلاق در پژوهش رعایت شده است. بررسی‌ها در دو بخش میدانی و آزمایشگاهی بود، ولی در هیچ‌یک، از اطلاعات مستقیم بیماران استفاده نشده و مطالعات بالینی نبوده است.

حامی مالی

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه دانشجویی کارشناسی ارشد نویسنده اول در گروه زیست‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد یادگار امام خمینی (ره) شهرری دانشگاه آزاد اسلامی است.

مشارکت نویسندگان

نویسنده مسئول، بعد نویسنده اول و سپس نویسنده سوم بیشترین مشارکت را داشتند.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند هیچ‌گونه تضاد منافعی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

تشکر و قدردانی

از مسئولین محترم واحد یادگار امام خمینی (ره) شهرری دانشگاه آزاد اسلامی که امکان مالی این تحقیق را فراهم آوردند، سرکار خانم دکتر فلسفی عضو هیئت‌علمی دانشگاه علوم‌پزشکی به جهت راهنمایی‌های ارزشمندشان و کارشناسان محترم آزمایشگاه تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی واحد یادگار امام خمینی (ره) شهرری خانم مهندس خسروی و خانم دکتر اعتمادی صمیمانه تشکر می‌کنیم.

15. Chenopodium quinoa
16. Mosleh Arany

References

[1] Yaghobi Nahad F, Omidi,B Davoudi F. [Design and synthesis of liposomal vancomycin and evaluation of its antibacterial effects on methicillin resistant staphylococcus aureus (Persian)]. NavidNo. 2021; 24(77):20-24. [DOI:10.22038/NNJ.2021.54048.1250]

[2] Khorakian F, Movahed T, Ghazvini K, Karbasi S, Tabrizi Nouri S, Bahramian L, et al. [Evaluation of frequency of microbial contamination in clinical setting surface in Dental School of Mashhad University of Medical Sciences (Persian)]. Journal of Mashhad Dental School. 2017; 41(3):209-18.[DOI:10.22038/JMDS.2017.9223]

[3] Cusumano JA , Dupper AC, Malik Y, Gavioli EM, Banga J, Caban AB, et al. Staphylococcus aureus bacteremia in patients infected with covid-19: A case series. Open Forum Infectious Diseases. 2020; 7(11):ofaa518. [PMID]

[4] Breidenstein EB, de la Fuente-Núñez C, Hancock RE. Pseudomonas aeruginosa: All roads lead to resistance. Trends in Microbiology. 2011; 19(8):419-26. [DOI:10.1016/j.tim.2011.04.005] [PMID]

[5] Abdi Andarabi S, Haji Seyed Mohammad Shirazi R, Anvar SAA. [Investigating the probability of water coolers contamination with pseudomonas aeruginosa in a number of Tehran Hospitals (Persian)]. Journal of Environmental Science and Technology. 2020; 22(5):214-22. [Link]

[6] Haghmorad Korasti A, Nazari R, Zargar M. [Study of microbial contamination of the public swimming pools with Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa and their physical parameters in Kermanshah, Iran (Persian)]. Qom University of Medical Sciences Journal. 2016; 10(7):65-73. [Link]

[7] Taghinejad J, Hosseinzadeh M, Molayi Kohneshahri Sh, Javan Jasor V. [Pseudomonas aeruginosa: A biological review (Persian)]. Journal of Laboratory & Diagnosis. 2017; 8(34):64-82. [Link]

[8] Mokhtari AR, Salehi T, Amini K, Shahcheraghi, F. [Isolation pseudomonas aeruginosa bacteria and genes integron class I of subclinical mastitis in dairy cows in Tehran (Persian)]. Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi). 2016; 29(2):37-44. [DOI:10.22034/VJ.2016.106059]

[9] Ramu K, Adarsh V, Rajagopal A, Varyani R, Kini P, Kumar P, et al. Influence of proteus sp. on trimethylamine n- oxide production via the choline metabolism pathway and the formulation of a predictive model to assess the risk of coronary artery disease in Indian patients. Iranian journal of Microbiology. 2022; 16(3):233-43. [DOI:10.30699/ijmm.16.3.233]

[10] Sindeldecker D, Stoodley P. The many antibiotic resistance and tolerance strategies of Pseudomonas aeruginosa. Biofilm. 2021; 3:100056. [DOI:10.1016/j.bioflm.2021.100056] [PMID] [PMCID]

[11] Nasr-Esfahani B, Roshnaei M, Fazeli H, Havaei SA, Moghim Sh, Ghasemian-Safaei H, et al. [The effect of isolated bacteriophage on multidrug resistant (MDR) pseudomonas aeruginosa (Persian)]. Journal of Isfahan Medical School. 2014; 32(307):1805-15. [Link]

[12] Kavusi M, Nematimansour F, Mahdiyoun SM. [The prevalence of antibiotic resistance in methicillin -resistant staphylococcus aureus and the determination of aminoglycoside resistance gene aac(6′) -Ie/aph (2″) isolated from hospitalized patientsin Imam Hossein, Loghman Hakim, and Pars Hospitals in Tehran using (Persian)]. Journal of Ilam University of Medical Sciences. 2019; 27(1):85-94. [DOI:10.29252/sjimu.27.1.85]

[13] Bilal S, Anam S, Mahmood T, Abdullah RM, Nisar S, Kalsoom F, et al. Antimicrobial profiling and molecular characterization of antibiotic resistant genes of Proteus vulgaris isolated from tertiary care hospital, Islamabad, Pakistan. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences. 2019; 32(6 Supplementary):2887-91. [PMID]

[14] Löwik CAM, Zijlstra WP, Knobben BAS, Ploegmakers JJW, Dijkstra B, de Vries AJ, et al. Obese patients have higher rates of polymicrobial and Gram-negative early periprosthetic joint infections of the hip than non-obese patients. PLoS One. 2019; 14(4):e0215035. [PMID]

[15] Mozaffarian V. [Dictionary of Iranian plant names (Persian)]. Farhang Moaser Publishers; 2010. [Link]

[16] Awwad Akl M, Amer MW, Salem NM, Abdeen AO. Green synthesis of zinc oxide nanoparticles (ZnO-NPs) using Ailanthus altissima fruit extracts and antibacterial activity. Chemistry International. 2020; 6(3):151-9. [DOI:10.5281/ZENODO.3559520]

[17] Ghafiyehsanj E, Dilmaghani K, Chaparzadeh N, Saadatmand S. Study on essential oil compositions of sage (Salvia nemorosa L.) collected from the North West of Iran at different growth stages. Periódico Tchê Química. 2020; 17(n°35):934-47. [DOI:10.52571/PTQ.v17.n35.2020.77_GHAFIYEHSANJ_pgs_934_947.pdf]

[18] Sadrnia M, Arjomandzadegan M. [Comparative study on the effects of Aloe vera extract in clinical strains of Staphylococcus aureus, Klebsiella, Staphylococcus epidermidis and Escherichia coli compared to antibiotics of choice (Persian]. Journal of Arak University Medical Sciences. 2014; 17(6):39-46. [Link]

[19] Ahmady-Asbchin S, Safari M, Moradi H, Sayadi V. [Antibacterial effects of methanolic and ethanolic leaf extract of Medlar (Mespilus germanica) against bacteria isolated from hospital environment (Persian)]. Arak Medical University Journal. 2013; 16(6):1-13. [Link]

[20] Kregiel D, Berlowska J, Witonska I, Antolak H, Proestos Ch, Babic M, et al. Saponin- based biological- active surfactants from plants. In: Najjar R, editor. Application and charaterzation of surfactants. London: IntechOpen; 2017. [DOI:10.5772/68062]

[21] Azwanida NN. A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. Medicinal & Aromatic Plants. 2015; 4:3. [DOI:10.4172/2167-0412.1000196]

[22] Willey JM, Sherwood LM, Woolverton CJ. Prescott, harley and klein's microbiology. New York: McGraw Hill; 2008. [Link]

[23] Khanafari A, Davoodi-Rad, Mehrabian S. [Pyoverdin pigment as a biomarker for Pseudomonas detection in foods and hygienic products (Persian)]. Medical Sciences Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch. 2013; 22(4):279-87. [Link]

[24] McFarland J. The nephelometer: An instrument for media used for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. JAMA. 1907; XLIX(14):1176-8. [DOI:10.1001/jama.1907.25320140022001f]

[25] Golus J, Sawicki R, Widelski J, Ginalska G. The agar microdilution method - a new method for antimicrobial susceptibility testing for essential oils and plant extracts. Journal of Applied Microbiology. 2016; 121(5):1291-9. [DOI:10.1111/jam.13253] [PMID]

[26] Zeb A, Sadiq A, Ullah F, Ahmad S, Ayaz M. Phytochemical and toxicological investigations of crude methanolic extracts, subsequent fractions and crude saponins of Isodon rugosus. Biological Research. 2014; 47(1):57. [PMID]

[27] Yousefi Z. [Study of the pollution condition of swimming pools in Sari city for the staphylococcus aureus (Persian)]. Iranian Journal of Health & Environment. 2009; 2(3):178-87. [Link]

[28] Poljuhaa D, Sladonjaa B, Šolab I, Dudašc S, Bilićd J, Rusakb G, et al. Phenolic composition of leaf extracts of ailanthus altissima (simaroubaceae) with antibacterial and antifungal activity equivalent to standard antibiotics. Natural Product Communications. 2017; 12(10):1609-12. [DOI:10.1177/1934578X1701201021]

[29] Ivano M, Božunović J, Gašić U, Drakulić D, Stevanović M, Rajčević N, et al. Bioactivities of Salvia nemorosa L. inflorescences are influenced by the extraction solvents. Industrial Crops and Products. 2022; 175:114260. [DOI:10.1016/j.indcrop.2021.114260]

[30] Al-Snafi AE. Antimicrobial effects of medicinal plants (part 3): plant based review. IOSR Journal of Pharmacy. 2016; 6(10):67-92. [Link]

[31] Mhada M, Metougui ML, El Hazzam K, El Kacimi K, Yasri A. Variations of saponins, minerals and total phenolic compounds due to processing and cooking of quinoa (chenopodium quinoa willd.) seeds. Foods. 2020; 9(5):660. [DOI:10.3390/foods9050660] [PMID] [PMCID]

[32] Them LT, Nguyen Dung PT, Nhat Trinh PhT, Hung QT, Tuong Vi LN, Trong Tuan N, et al. Saponin, Polyphenol, flavonoid content and α-glucosidase Inhibitory activity, antioxidant potential of launaea sarmentosa leaves grown in ben tre province, Vietnam. Paper presented at: 6th International Conference on Mechanical Engineering, Materials Science and Civil Engineering. 21-22 December 2018; Xiamen, China. [DOI:10.1088/1757-899X/542/1/012036]

[33] Mosleh Arany A, Nemati N, Zandi H, Naderi M. [The antibacterial activity of the water extracts of three species of Salvia on Staphylococcus aureus, Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa (Persian)]. Nova Biologica Reperta. 2020; 6(4):446-53. [DOI:10.29252/nbr.6.4.446]

This Page Intentionally Left Blank