Antibacterial effects of *Artemisa aucheri* leaf and Spirulina Blue-Green algae aqueous and alcoholic extracts on the multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolated from the patients with pneumonia

Samaneh Rouhi[1, 2, 3], Rashid Ramazanzadeh[4], Shadieh Mohammadi[5], Alina Abodollahi[6, 7], Pegah Shakib[8], Bahman Mohammadi[9], Amjad Ahmadi[10]

1. PhD of Medical Bacteriology, Student Research Committee, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran., (Corresponding author), Tel: +982833328709, E-mail: roohi.samanh@yahoo.com, ORCID ID: 0000-0003-0160-0924
2. PhD of Medical Bacteriology, Children Growth Research Center, Research Institute for Prevention of Non-Communicable Diseases, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran. ORCID ID: 0000-0003-0160-0924
3. PhD of Medical Bacteriology, Clinical Research Development Unit, Kosar Hospital, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran. ORCID ID: 0000-0003-0160-0924
4. Professor of Medical Bacteriology, Cellular and Molecular Research Center, Research Institute for Health Development, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran. ORCID ID: 0000-0002-1644-6352
5. Assistant Professor of Food Hygiene, Environmental Health Research Center, Research Institute for Health Development, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran. ORCID ID: 0000-0002-0711-4305
6. PhD Student of Malecular Medicine, Student Research Committee, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran. ORCID ID: 0000-0002-5282-4672
7. PhD Student of Malecular Medicine, Cellular and Molecular Research Center, Research Institute for Health Development, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran. ORCID ID: 0000-0002-5282-4672
8. Assistant Professor of Medical Bacteriology, Razi Herbal Medicines Research Center, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran. ORCID ID: 0000-0003-3525-226X
9. MSc of Medical Microbiology, Student Research Committee, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran. ORCID ID: 0000-0002-2345-246X
10. MSc of Medical Microbiology, Cellular and Molecular Research Center, Research Institute for Health Development, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran. ORCID ID: 0000-0001-9722-8826

ABSRTRACT

Background and Aim: Antibacterial effects of *Artemisia* plant and algae have been confirmed. The purpose of this study was to evaluate the antibacterial effect of antibiotics, Spirulina blue-green algae and *Artemisa aucheri* leaf extracts on multidrug resistant (MDR) *Klebsiella pneumoniae*.

Materials and Methods: Disk and well diffusion method, the growth minimum inhibitory and bactericidal concentrations (MIC and MBC) were used to evaluate antibacterial effects. Using SPPS 16 soaftware, data were analyzed by analysis of variance (ANOVA) with repeated measures and Bonferroni test ($p \leq 0.001$).

Results: The MIC and MBC for amikacin, colicitin, ceftazidime were 4 and for gentamicin and nalidixic acid were 2 and 1 µg/µl, respectively. In disk and well diffusion methods, the highest growth inhibition zones belonged to ethanolic extracts (0.25 mg/ml) of *Artemisia* and algae. The best MIC and MBC for growth were related to ethanolic extracts of *A. aucheri* at the concentration of 0.15 mg/ml. The diameter of growth inhibition zone around the bacterium was directly related to the concentrations of *Artemisia* and Algae extracts ($p = 0.000$).

Conclusion: Considering the beneficial antibacterial effects of Spirulina blue-green algae and *A. aucheri* which were confirmed in this study, extraction of the active ingredients of medicinal plants is recommended for the mass production of herbal medicines.

Keywords: Antibacterial effect, Extracts, *Artemisa aucheri*, Spirulina blue-green algae, *Klebsiella pneumoniae*

Received: July 21, 2019 **Accepted:** Oct 30, 2019

How to cite the article: Samaneh Rouhi, Rashid Ramazanzadeh, Shadieh Mohammadi, Alina Abodollahi, pegah Shakib, Bahman Mohammadi, Amjad Ahmadi. Antibacterial effects of *Artemisa aucheri* leaf and Spirulina Blue-Green algae aqueous and alcoholic extracts on the multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolated from the patients with pneumonia.ŚJKU. 2020;25(4):124-139.

Copyright © 2020 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-04-27]

[DOI: 10.52547/sjku.25.4.124]

بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره آبی و الکلی برگ درمنه کوهی و جلبک سبز–آبی اسپیرولینا بر باکتری *کلبسیلا پنومونیه* با مقاومت دارویی چندگانه جدا شده از بیمار با عفونت پنومونی

سمانه روحی[۱،۲،۳]، رشید رمضانزاده[۴]، شادیه محمدی[۵]، آلینا عبدالهی[۶،۷]، پگاه شکیب[۸]، بهمن محمدی[۹]، امجد احمدی[۱۰]

۱. دکترای باکتری‌شناسی پزشکی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران.، (نویسنده مسئول)، تلفن: ۰۲۸۳۳۳۲۸۷۰۹، پست الکترونیک: roohi.samaneh@yahoo.com، کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۳-۰۱۶۰-۰۹۲۴

۲. دکترای باکتری‌شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات رشد کودکان، پژوهشکده پیشگیری از بیماری های غیر واگیر، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران. کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۳-۰۱۶۰-۰۹۲۴

۳. دکترای باکتری‌شناسی پزشکی، واحد توسعه تحقیقات بالینی، بیمارستان کوثر، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران. کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۳-۰۱۶۰-۰۹۲۴

۴. استاد باکتری‌شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، پژوهشکده توسعه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران. کد ارکید: ۶۳۵۲ -۱۶۴۴-۰۰۰۰-۰۰۰۲

۵. استادیار بهداشت مواد غذایی، مرکز تحقیقات بهداشت محیط، پژوهشکده توسعه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران. کد ارکید: ۴۳۰۵-۰۷۱۱-۰۰۰۲-۰۰۰۰

۶. دانشجوی دکترای پزشکی مولکولی،کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران.کد ارکید: ۴۶۷۲-۵۲۸۲-۰۰۰۲-۰۰۰۰

۷. دانشجوی دکترای پزشکی مولکولی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، پژوهشکده توسعه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران. کد ارکید: ۴۶۷۲-۵۲۸۲-۰۰۰۲-۰۰۰۰

۸. استادیار باکتری‌شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی رازی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم‌آباد، ایران. کد ارکید: ۲۲۶x-۳۵۲۵-۰۰۰۳-۰۰۰۰

۹. کارشناس ارشد میکروب‌شناسی پزشکی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران. کد ارکید: ۲۴۶x -۲۳۴۵-۰۰۰۲-۰۰۰۰

۱۰. کارشناس ارشد میکروب‌شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، پژوهشکده توسعه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران. کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۱-۹۷۲۲-۸۸۲۶

چکیده

زمینه و هدف: اثر ضد باکتریایی گیاه درمنه و جلبک در تحقیقات علمی نشان داده شده است. تحقیق حاضر به منظور بررسی اثر ضد باکتریایی آنتی بیوتیک‌ها، عصاره‌های جلبک سبز-آبی اسپیرولینا و برگ درمنه کوهی روی *کلبسیلا پنومونیه* با مقاومت دارویی چندگانه، انجام شد.

مواد و روش‌ها: روش انتشار در دیسک و چاهک و تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی از رشد و کشندگی جهت بررسی اثرات ضد باکتریایی بکار رفتند. جهت تجزیه‌وتحلیل داده‌ها، نرم افزار SPSS ۱۶ با آزمون آنالیز واریانس با اندازه‌های مکرر و بنفرونی استفاده شدند ($P\leq ۰/۰۰۱$).

یافته‌ها: حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد و کشندگی آمیکاسین، کولیستین و سفتازیدیم ۴ و جنتامایسین و نالیدیکسیک اسید به ترتیب ۲ و ۱ میکروگرم بر میکرولیتر بود. در هردو روش انتشار از دیسک و چاهک بیشترین اندازه حلقه تشکیل شده مهار رشد، در اثر کاربرد عصاره درمنه و جلبک در عصاره اتانولی ۰/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. بهترین میزان حداقل غلظت ممانعت از رشد مربوط به عصاره‌های اتانولی درمنه کوهی در ۰/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. قطر هاله ممانعت از رشد اطراف باکتری با میزان غلظت عصاره‌های درمنه و جلبک رابطه مستقیم داشت ($P= ۰/۰۰۰$).

نتیجه‌گیری: اثرات ضد باکتریایی جلبک سبز-آبی اسپیرولینا و درمنه کوهی در این مطالعه ثابت شد. استخراج ماده مؤثره گیاهان دارویی برای تولید انبوه داروهای گیاهی با توجه به اثرات بهتر آن ها لازم است.

کلمات کلیدی: اثر ضد باکتریایی، عصاره، درمنه کوهی، جلبک سبز-آبی اسپیرولینا، *کلبسیلا پنومونیه*

وصول مقاله: ۹۸/۴/۳۰ اصلاحیه نهایی: ۹۸/۷/۲۸ پذیرش: ۹۸/۸/۸

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-04-27]

[DOI: 10.52547/sjku.25.4.124]

مقدمه

درمان عفونت‌های ناشی از باکتری‌ها به‌وسیله آنتی بیوتیک ها انجام می‌گیرد؛ اما در بسیاری از موارد درمان با آنتی بیوتیک به علت بروز مقاومت دارویی و همچنین مقاومت دارویی چندگانه Multidrug Resistant (MDR) (حداقل به یک آنتی‌بیوتیک در دو یا بیشتر از دو رده آنتی بیوتیکی مقاوم می‌باشند) با شکست مواجه می‌شود(۱). تغییرات ژنتیکی در باکتری‌ها، مصرف خودسرانه آنتی‌بیوتیک، میزان دسترسی به آنتی‌بیوتیک‌های وسیع الطیف و جدید، شرایط زمانی، مکانی، وضعیت فرهنگی و بهداشتی باعث به وجود آمدن انواعی از این سویه‌های باکتریایی مقاوم به دارو شده است(۲)؛ بنابراین با توجه به ظهور چنین سویه‌های باکتریایی مقاوم به داروهای شیمیایی، تلاش برای یافتن عوامل ضد میکروبی جدید ضروری است. امروزه تحقیق در مورد داروهای جدید گرفته‌شده از منابع طبیعی به عنوان یک راه سیستماتیک و دارای ارزش استراتژی و اقتصادی در سطح جهان اهمیت خاصی پیدا کرده است(۵-۳). گیاهان، جلبک‌ها و ترکیبات آن‌ها مانند اسانس ها و عصاره‌ها، دارای توانایی بالقوه جهت جایگزینی به جای داروهای شیمیایی هستند. این در حالی است که عوارض جانبی این ترکیبات در مقایسه با داروهای شیمیایی کمتر است. یکی از انواع گیاهانی که اثر دارویی آن ثابت شده است گیاه درمنه *Artemisia* است(۸-۵). گیاه درمنه جزء خانواده کاسنی‌ها می‌باشد. حدود ۲۰۰ تا ۴۰۰ گونه‌ی آن در جهان وجود دارد. این تعداد گونه بر اساس شرایط آب و هوایی مناطق مختلف رشد می‌کنند. در ایران ۳۴ گونه درمنه شناسایی شده است(۹). بسیاری از گونه‌های درمنه معطر و غنی از عصاره هستند که دلیل کاربرد آنها در طب سنتی است؛ زیرا از نظر ترکیبات شیمیایی، عصاره‌های گیاهی دارای پلی پرانوییدها، ترکیبات معطر و سس کوئی ترپن‌ها هستند، ترکیبات مذکور دارای گروه‌های فنلی در ساختمان خود می‌باشند که بر روی باکتری‌ها اثرات ضد میکروبی به وجود می‌آورد(۶ ،۵). دو گونه درمنه دشتی *Artemisia sieberi* و درمنه کوهی *Artemisa aucheri* در مناطق استپی و نیمه استپی رشد می‌کنند. جهت رشد درمنه کوهی، بیش از ۳۰۰ میلی‌متر بارندگی سالیانه در منطقه رشد ضروری می‌باشد(۱۰). درمنه دشتی نیز عنصر اصلی و غالب استپ‌های بخش نیمه خشک کشور محسوب می‌شود(۱۱). مصرف گونه‌های درمنه کوهی و دشتی باعث کاهش التهاب و تب می‌شود. همچنین خاصیت ضد باکتریایی، ضد ویروسی، ضد مالاریایی، ضد قارچی وآنتی اکسیدانی آن‌ها نیز ثابت شده است(۱۲). گیاهان متابولیت های ثانویه‌ای را در طی مسیر بیوسنتزی خود می‌سازند. آلکالوئیدها، فلاونوئیدها، ایزوفلاونوئیدها، تانن‌ها، گلیکوزیدها، ترپن‌ها و ترکیبات فنلی از جمله این متابولیت های ثانویه هستند که قادرند خواص ضد میکروبی را به وجود آورند. این ترکیبات باعث تخریب دیواره سلولی و پروتئین‌های باکتری‌ها، تداخل با عمل آنزیم‌های غشایی و رونویسی DNA و RNA می‌شوند و در نتیجه علت تخریب سلول‌های میکروب و از بین بردن آن می‌باشند(۶). همچنین مهار فعال‌شدن و تکثیر لنفوسیت‌ها و مهار ترشح نیتریک اکساید از ماکروفاژها توسط ترکیبات گیاهی امکان پذیر است که باعث فعالیت ضد التهابی می‌شود(۱۳). تأثیر اسانس برگ درمنه کوهی روی *تریکوموناس واژینالیس* در محیط کشت بررسی و نشان داده شده است(۱۴). در تحقیقی دیگر نیز اسانس گرفته‌شده از برگ درمنه دشتی دارای اثر ضد باکتریایی بر گونه‌های باکتری‌های استافیلوکوکوس، *باسیلوس*، *اشریشیا کلی*، *انتروکوک* و *سودوموناس* بودند(۱۵). همچنین خصوصیات ضد میکروبی برگ درمنه دشتی نیز بر گونه‌های *شیگلا*، *سالمونلا* و *هموفیلوس* نیز گزارش شده است(۱۶). جلبک‌ها نیز منبعی از ترکیبات مفید و فعال زیستی هستند و تاکنون ترکیبات زیستی متعدد و با گستره کاربردی متنوعی از آن‌ها تولید شده است(۸). در کشور ایران جلبک‌های دریایی از سه خانواده جلبک‌های سبز، قهوه‌ای و قرمز در سواحل جزر و مدی چابهار یافت می‌شود و تمامی این جلبک‌ها در فصول مختلفی از سال

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-04-27]

[DOI: 10.52547/sjku.25.4.124]

قابل بهره‌برداری هستند(۱۷ ،۱۶). جلبک‌ها اثرات آنتی بیوتیکی، ضدویروسی، ضدقارچی و ضدسرطانی دارند و بسیاری از متابولیت‌های اولیه و ثانویه این جانداران می‌توانند به مواد فعال در صنایع دارویی تبدیل شوند؛ زیرا ترکیبات جلبک‌ها دارای رنگ‌دانه‌های بتاکاروتین و فوکوگزانتین، اسیدهای حلال مواد و مواد محرک ایمنی مانند فیکوسیانین، پلی ساکارید، آهن، روی و اسیدهای آمینه ضروری است که سبب ارتقا ایمنی می‌گردد و با مکانیسمی مشابه با ترکیبات گیاهی اثرات ضد میکروبی را اعمال می‌کنند(۱۸). اثر ضدباکتریایی جلبک قرمز گراسیلاریا ارکواتا بر روی باکتری‌های *پرتئوس ولگاریس*، *ویبریو کلرا*، *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* ثابت شده است(۱۹). همچنین در تحقیقی دیگر اثر ضد باکتریایی جلبک‌های سبز *انترومورفا اینتستینالیس* و جلبک قهوه‌ای *سیستوسیرا مایریکا* بر باکتری *لیستریا مونوسایتوژنز* نیز گزارش شده است(۲۰). در تحقیقی دیگر اثر ضد باکتریایی گیاه‌ترش واش بر روی باکتری *کلبسیلا پنومونیه* ثابت شد(۲۱). با توجه به افزایش روز افزون مقاومت دارویی در میکروب‌های مختلف از جمله *کلبسیلا پنومونیه* (باکتری مذکور یک باکتری گرم منفی و از خانواده انتروباکتریاسه و عامل عفونت ریه، خون و دستگاه ادراری است) و نیز اثرات ضد میکروبی گیاهان و جلبک‌ها، جهت انجام این پژوهش تصمیم گرفته شد تا با بررسی اثر ضد میکروبی گیاه درمنه و جلبک که جزو گیاهان بومی کشور می‌باشند و مقایسه آن با اثر ضد میکروبی آنتی‌بیوتیک‌های متداول در درمان عفونت‌های حاصل از *کلبسیلا پنومونیه*، گامی مثبت در جهت درمان عفونت حاصل از این باکتری بدون استفاده از داروهای شیمیایی و ظهور سویه‌های مقاوم برداشته شود. این در حالی است که عوارض جانبی این ترکیبات در مقایسه با داروهای شیمیایی بسیار کمتر است. با توجه به مطالب گفته شده اهمیت بحث مقاومت‌های دارویی و نیاز جوامع بشری به کشف داروهای جدید با اثرات جانبی کمتر و اثر درمانی بیشتر مورد توجه است. در این تحقیق میزان خاصیت ضد باکتریایی عصاره های آبی و الکلی برگ درمنه کوهی و جلبک سبز-آبی اسپیرولینا Spirulina blue-green algae در غلظت‌های مختلف، بر نمونه های باکتری *کلبسیلا پنومونیه* با مقاومت دارویی چندگانه جدا شده از بیماران مورد آزمایش قرار گرفته است. همچنین مقایسه میزان اثر ضد باکتریایی عصاره‌های گرفته شده از جلبک سبز-آبی اسپیرولینا و برگ گیاه درمنه کوهی با آنتی‌بیوتیک‌هایی که نمونه باکتری *کلبسیلا پنومونیه* نسبت به آن‌ها مقاومت دارویی چندگانه دارد نیز از اهداف دیگر این تحقیق است.

مواد و روش‌ها

نوع مطالعه

مطالعه حاضر یک مطالعه تجربی-آزمایشگاهی است. این مطالعه در آزمایشگاه میکروب‌شناسی مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی کردستان، شهر سنندج در استان کردستان انجام شد.

تهیه و تشخیص باکتری *کلبسیلا پنومونیه*:

نمونه بالینی باکتری *کلبسیلا پنومونیه* جدا شده از خلط بیمار مبتلا به پنومونی، از آزمایشگاه بیمارستان بعثت در سال ۱۳۹۴ در سنندج تهیه شد. روش‌های میکروب‌شناسی و بیوشیمیایی جهت تشخیص و تائید باکتری *کلبسیلا پنومونیه* استفاده شد. آزمایش‌های فنوتیپی میکروب‌شناسی شامل کشت بر روی محیط بلاد و انتخابی مک کانکی آگار (کلونی‌های موکوئیدی و چسبناک روی محیط کشت به وجود می‌آورد) (Germany، Merck)، رنگ‌آمیزی گرم (در رنگ‌آمیزی گرم باکتری به‌صورت کوکوباسیل گرم منفی دیده می‌شود)، آزمایش اکسید از (اکسید از منفی) و کاتالاز (کاتالاز منفی) (Iran، Padtan Teb)، کشت در محیط سیمون-سیترات (سیترات مثبت است و محیط را از رنگ سبز به آبی تبدیل می‌کند) (Germany، Merck)، کشت در محیط سولفید-ایندول-موتیلیتی (تولید سولفید در این باکتری منفی است، حرکت این باکتری منفی، آزمایش ایندول در این باکتری منفی است) (Germany، Merck)،

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-04-27]

[DOI: 10.52547/sjku.25.4.124]

آزمایش متیل رد (این باکتری متیل رد منفی است) و وگس پرسکوئر (این باکتری وگس پرسکوئر مثبت است) (Germany، Merck) و تریپل شوگر آیرون آگار (این باکتری قندها را در این محیط مصرف می‌کند و سطح و انتهای محیط زرد می‌شود) (Germany، Merck) جهت شناسایی فنوتیپی این باکتری انجام شد. همچنین آزمایش هایپرموکوسیته (موکوس یا حالت لزج این باکتری روی محیط کشت بالا است) برای این باکتری مثبت است و زمانی که به‌وسیله لوپ این باکتری از محیط کشت بلاد آگار جدا می‌شود به اندازه ۵ سانتی متر حالت کششی دارد(۲۲). قابل ذکر است در این مطالعه یک نمونه باکتری با مقاومت دارویی چندگانه از بیمارستان برداشته و آزمایش‌های مورد نظر روی آن انجام شد.

آماده‌سازی باکتری نیم مک فارلند:

کدورت ۰/۵ مک فارلند $۱۰^{۸} \times ۱/۵$ از باکتری تهیه و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (GBC– Cintra ،Australia) تنظیم شد. سپس رقت سازی انجام و میزان مک فارلند به $۱۰^{۶} \times ۱/۵$ باکتری کاهش یافت(۲۳، ۷).

روش فنوتیپی انتشار از دیسک جهت تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی

روش فنوتیپی انتشار از دیسک مطابق با دستورالعمل Clinical and Laboratory (CLSI) Standards Institute صورت گرفت. در این روش از آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین (۳۰ میکروگرم)، آمیکاسین (۳۰ میکروگرم)، کولیسیتین (۱۰ میکروگرم)، نالیدیکسیک اسید (۳۰ میکروگرم)، سفتازیدیم (۳۰ میکروگرم) (Roscoe, Denmark) استفاده شد. باکتری نیم مک فارلند روی محیط کشت مولر هینتون آگار (Merck ،Germany) به‌وسیله سواب کشت سفره‌ای داده شد و سپس دیسک‌های آنتی‌بیوتیک به فاصله ۲ سانتی‌متر از هم روی محیط کشت قرار گرفتند. پس از ۲۴ ساعت انکوبه شدن در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، مطابق با دستورالعمل CLSI هاله ممانعت از رشد به‌وسیله خط کش اندازه‌گیری و خوانده و با جدول CLSI مقایسه شد(۲۴، ۲).

تعیین حداقل غلظت ممانعت کنندگی Minimum Inhibitory Concentration (MIC) و کشندگی Minimum Bactericidal Concentration (MBC) آنتی‌بیوتیک‌ها

جهت تعیین حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد و کشندگی باکتری از پودرهای آنتی‌بیوتیکی جنتامایسین، آمیکاسین، کولیسیتین، نالیدیکسیک اسید، سفتازیدیم (Aldrich-Sigma, USA) استفاده شد. در ابتدا استوک ۲ میلی گرم در ۱ میلی‌لیتر آب مقطر استریل تهیه شد. سپس سری رقت‌های ۳۲، ۱۶، ۸، ۴، ۲ ، ۱، ۰/۵، ۰/۲۵، ۰/۱۲ و ۰/۰۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه شد. روش فوق به‌صورت میکرو دایلوشن براث انجام شد. به اندازه ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌ها درون چاهک‌های میکروپلیت به‌طور جداگانه (ده چاهک) ریخته شد. ۱۰۰ میکرولیتر محیط مولرهینتون براث نیز داخل هر ده چاهک ریخته شد. بعد از تهیه غلظت نیم مک فارلند از باکتری، به اندازه ۵۰ میکرولیتر از باکتری به هر چاهک اضافه شد. پس از انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت، حداقل غلظت ممانعت کنندگی آن خوانده شد. به این ترتیب که اولین چاهک کدر نظر گرفته شد و چاهک قبل از آن به عنوان حداقل غلظت ممانعت کنندگی مطابق با دستورالعمل CLSI خوانده و مقایسه شد. جهت تعیین حداقل غلظت کشندگی، از چاهک‌هایی که حداقل غلظت ممانعت کنندگی را نشان دادند، در محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد و تشکیل یا عدم تشکیل کلونی بعد از ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون بررسی شد. چاهک شماره ۱۰ و ۱۱ به ترتیب به عنوان کنترل مثبت (محیط کشت و باکتری) و منفی (فقط محیط کشت) در نظر گرفته شدند(۲۵-۲۳).

تهیه و آماده‌سازی عصاره‌های جلبک و درمنه:

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-04-27]

[DOI: 10.52547/sjku.25.4.124]

جلبک سبز-آبی اسپیرولینا از سواحل دریای خزر در استان مازندران و گیاه درمنه کوهی از دشت‌های بهشهر در استان مازندران در سال ۱۳۹۴ تهیه شد. در این مطالعه عصاره جلبک و درمنه به صورت زیر تهیه و به ترتیب از دانشگاه علوم پزشکی کردستان و دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل دریافت شدند (قابل ذکر است تمامی آزمایش‌های در آزمایشگاه میکروب‌شناسی و مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی کردستان انجام شد. به استثنای این که عصاره درمنه کوهی در آزمایشگاه میکروب شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل آماده شد). جلبک‌ها و گیاه درمنه کاملاً شسته شدند و سپس شن و ماسه داخل آن جدا شد. سپس در آب مقطر غوطه ور شدند تا املاح آن خارج شوند و هر چند ساعت آب آن‌ها تعویض گردید. بعد از حذف کامل آب در دمای اتاق خشک و به وسیله‌ی آسیاب برقی تبدیل به پودر شدند. ابتدا ۵۰ گرم پودر خشک شده توزین و به ارلن منتقل شد، سپس به‌طور جداگانه ۵۰۰ میلی‌لیتر اتانول (Germany، Merck) و متانول (Merck Germany،) (جهت تهیه عصاره الکلی) و ۲۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل (جهت تهیه عصاره آبی) به ترتیب جهت تهیه عصاره‌های اتانولی، متانولی و الکلی به آن‌ها افزوده شد. سپس ارلن‌ها تکان داده شدند و بعد به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی نگه‌داری شدند. در این حالت سر ارلن با پارا فیلم پوشانده شد تا مواد تبخیر نشود. سپس ارلن‌ها روی مگنت جهت هم زدن به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند. بعد از این مرحله مایع بالایی ارلن داخل لوله فالکون ریخته و مایع پایینی دور ریخته شد. بعد از سانتریوفیوژ (۱۰ دقیقه- ۴۰۰۰rpm)، مایع بالایی از کاغذ صافی واتمن شماره ۱ گذرانده و مایع صاف شده داخل دستگاه روتاری قرار داده شد. بعد از این مرحله، رسوب داخل پلیت ریخته و به انکوباتور انتقال داده شد. بعد از خشک شدن کامل عصاره از آن در تحقیق استفاده شد(۲۶).

غلظت‌سازی عصاره‌ها:

غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۲، ۰/۱۵ و ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی لیتر از عصاره‌های آبی و الکلی برگ درمنه کوهی و جلبک سبز آبی اسپیرولینا تهیه شد. جهت رقیق‌سازی میلی‌گرم پودر جامد گیاه در میلی‌لیتر مایع حلال؛ آب، اتانول و متانول مطابق با میزان ذکر شده حل شد (مثلاً ۲۵ میلی‌گرم=۰/۰۲۵ گرم (۱ گرم=۱۰۰۰ میلی‌گرم) پودر گیاه در ۱۰۰ میلی‌لیتر حلال=۰/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)(۷).

روش انتشار از دیسک جهت تعیین اثرات ضد باکتریایی عصاره‌ها:

با استفاده از سوآب، باکتری نیم مک فارلند روی محیط کشت مولر هینتون آگار به‌صورت سفره ای کشت داده شدند. روی هرکدام از دیسک‌های خالی (پادتن طب، ایران) به‌وسیله‌ی سمپلر، حجم ۱۵ میکرو لیتر از غلظت‌های تهیه شده عصاره‌ها ریخته و سپس پلیت‌ها برای ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند (آنتی‌بیوتیک ایمیپنم (۱۰ میکروگرم) (Aldrich-Sigma, USA) به عنوان کنترل مثبت و از محلول دی متیل سولفوکسید ٪۱۰۰ (Germany، Merck) به عنوان کنترل منفی استفاده گردید). پس از ۲۴ ساعت انکوبه شدن در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، هاله ممانعت از رشد به‌وسیله خط کش اندازه- گیری و خوانده شد. برای حصول اطمینان، آزمایش‌ها سه بار تکرار گردیدند و میانگین قطر هاله‌های عدم رشد بر حسب میلی‌متر گزارش شدند(۲۷).

روش انتشار از چاهک جهت تعیین اثرات ضد باکتریایی عصاره‌ها:

با استفاده از پیپت پاستور، چاهک‌هایی به قطر ۷ میلی‌متر روی محیط کشت مولرهینتون آگار حفر گردید. سپس سوسپانسیون میکروبی معادل نیم مک فارلندی که تهیه شده بود بر سطح محیط مولر هینتون آگار به صورت سفره ای به‌وسیله سوآب کشت داده شد. حجم ۱۰۰ میکرولیتر از هر یک از غلظت‌های مختلف از عصاره‌ها در هر یک از چاهک ها ریخته شد. سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس با اندازه‌گیری قطر

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-04-27]

[DOI: 10.52547/sjku.25.4.124]

هاله‌های عدم رشد در اطراف هر یک از چاه ها توسط خط‌کش میزان، حساسیت یا مقاومت باکتری‌های مورد نظر به عصاره‌ها تعیین شدند (آنتی‌بیوتیک ایمیپنم با غلظت ۱۲۸ میکروگرم بر میکرولیتر (Aldrich-Sigma, USA) به عنوان کنترل مثبت و از محلول دی متیل سولفوکسید ۱۰۰٪ به عنوان کنترل منفی استفاده گردید). برای حصول اطمینان، آزمایش‌های سه بار تکرار گردیدند و میانگین قطر هاله‌های عدم رشد بر حسب میلی‌متر گزارش شدند(۷).

تعیین حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد و کشندگی عصاره‌ها:

روش فوق به صورت میکرودایلوشن براث انجام شد. غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۲، ۰/۱۵ و ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره‌های آبی و الکلی برگ درمنه کوهی و جلبک سبز آبی اسپیرولینا که تهیه شده بودند، به اندازه ۱۰۰ میکرولیتر درون چاهک‌های میکروپلیت به‌طور جداگانه (چهار چاهک) ریخته شد. ۱۰۰ میکرولیتر محیط مولرهینتون براث (Germany، Merck) نیز داخل هر چهار چاهک ریخته شد. بعد از تهیه غلظت نیم مک فارلند از باکتری، به اندازه ۵۰ میکرولیتر از باکتری به هر چهار چاهک اضافه و پس از انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد در ۲۴ ساعت، حداقل غلظت ممانعت کنندگی آن خوانده شد. به این ترتیب که اولین چاهک کدر در نظر گرفته شد و چاهک قبل از آن به عنوان حداقل غلظت ممانعت کنندگی مورد نظر قرار گرفت. جهت تعیین حداقل غلظت کشندگی، از چاهک های دارای حداقل غلظت ممانعت کنندگی در محیط بلاد آگار کشت داده و سپس پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. در نهایت تشکیل یا عدم تشکیل کلونی باکتریایی بررسی شد. چاهک شماره ۵ و ۶ به ترتیب به عنوان کنترل مثبت (محیط کشت و باکتری) و منفی (فقط محیط کشت) در نظر گرفته شدند. برای هر دو نوع عصاره این عمل انجام شد. برای حصول اطمینان، آزمایش‌های سه بار تکرار شد(۲۶، ۲۵).

روش آماری:

نتایج بدست آمده وارد نرم افزار SPSS ۱۶ شد. جهت تعیین نرمال بودن داده‌ها، آزمون کولموگروف _ اسمیرنوف بکار گرفته شد. همچنین با توجه به اینکه اندازه-گیری اتانول، متانول و عصاره آبی در سه نوبت و در غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۲، ۰/۱۵ و ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر صورت گرفت، جهت بررسی اثر زمان اندازه‌گیری و مقایسه روش‌های انتشار (دیسک و چاهک) و همچنین مقایسه اثرات ضد باکتریایی جلبک و درمنه، جهت آنالیز داده‌ها (با در نظر گرفتن ماهیت داده‌ها) از آزمون آنالیز واریانس با اندازه‌های مکرر استفاده شد. جهت مقایسه‌های دوتایی متغیرها از آزمون بنفرونی استفاده شد ($P\leq$ ۰/۰۰۱).

یافته‌ها

سویه دارای مقاومت دارویی چند گانه جدا شده از بیماران که در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفتند به جنتامایسین (۳۰ میکروگرم) و آمیکاسین (۳۰ میکروگرم) از رده آمینوگلیکوزیدها، کولیسیتین (۱۰ میکروگرم) از رده پلی پپتید ها، نالیدیکسیک اسید (۳۰ میکروگرم) از رده کینولون ها و سفتازیدیم (۳۰ میکروگرم) از رده بتالاکتام‌ها مقاوم بود.

نتایج حاصل از تعیین حداقل غلظت ممانعت کنندگی و کشندگی آنتی‌بیوتیک‌ها بر *کلبسیلا پنومونیه* نشان داد که حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد و کشندگی به ترتیب برای آنتی‌بیوتیک‌های آمیکاسین، کولیسیتین و سفتازیدیم ۴ میکروگرم بر میکرولیتر و جنتامایسین و نالیدیکسیک اسید به ترتیب ۲ و ۱ میکروگرم بر میکرولیتر بود. نتایج حاصل از سه بار تکرار آزمایش فنوتیپی انتشار از دیسک برای هر سه عصاره اتانولی، متانولی و آبی جلبک سبز-آبی اسپیرولینا نشان داد که بیشترین هاله عدم رشد در اثر بکارگیری عصاره اتانولی در غلظت‌های ۰/۱، ۰/۱۵، ۰/۲ و ۰/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ترتیب ۱۰، ۱۴/۳۳، ۱۹ و ۲۱/۶۷ میلی‌متر بود. این میزان برای عصاره متانولی در

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-04-27]

[DOI: 10.52547/sjku.25.4.124]

غلظت‌های مذکور به ترتیب ۸/۳۳، ۱۵، ۱۵/۶۷ و ۱۷ میلی-متر بود. همچنین در رابطه با عصاره آبی این میزان ۲/۳۳، ۵، ۸ و ۸/۶۷ میلی‌متر بود (جدول ۱). در مورد درمنه کوهی، بیشترین هاله ممانعت از رشد برای عصاره اتانولی در غلظت‌های ۰/۱، ۰/۱۵، ۰/۲ و ۰/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ترتیب ۲/۳۳، ۱۴/۱۷، ۱۷/۳۳ و ۲۵/۶۷ میلی‌متر و برای عصاره متانولی به ترتیب ۹/۶، ۱۳/۵، ۱۶/۶۷ و ۱۸/۶۷ میلی‌متر بود. این میزان برای عصاره آبی ۱/۵، ۵، ۴/۵ و ۵ میلی‌متر بود (جدول ۲).

جدول ۱. میانگین و انحراف استاندارد (Mean±Se) قطر هاله ممانعت از رشد (میلی‌متر) غلظت‌های مختلف عصاره‌های الکلی و آبی (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) جلبک سبز-آبی اسپیرولینا بر *کلبسیلا پنومونیه* در روش انتشار از دیسک

غلظت / عصاره	۰/۱	۰/۱۵	۰/۲	۰/۲۵	ایمیپنم	دی متیل سولفوکسید
عصاره اتانولی	۱۰ ± ۰/۰	۱۴/۳۳ ± ۰/۹۴	۱۹ ± ۱/۴۱	۲۱/۶۷ ± ۲/۳۵	۳۰	۰
عصاره متانولی	۸/۳۳ ± ۰/۴۷	۱۵ ± ۰	۱۵/۶۷ ± ۱/۲۵	۱۷ ± ۱/۴۱	۳۰	۰
عصاره آبی	۲/۳۳ ± ۰/۴۷	۵ ± ۰/۰	۸ ± ۰/۰	۸/۶۷ ± ۰/۲۴	۳۰	۰

*(SE) standard error، کنترل مثبت: ایمیپنم (۱۰ میکروگرم)، کنترل منفی: دی متیل سولفوکسید ۱۰۰٪

جدول ۲. میانگین و انحراف استاندارد (Mean±Se) قطر هاله ممانعت از رشد (میلی‌متر) غلظت‌های مختلف عصاره‌های الکلی و آبی (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) درمنه کوهی بر *کلبسیلا پنومونیه* در روش انتشار از دیسک

غلظت / عصاره	۰/۱	۰/۱۵	۰/۲	۰/۲۵	ایمیپنم	دی متیل سولفوکسید
عصاره اتانولی	۲/۳۳ ± ۱/۶۹	۱۴/۱۷ ± ۰/۸۵	۱۷/۳۳ ± ۰/۹۴	۲۵/۶۷ ± ۰/۹۴	۳۰	۰
عصاره متانولی	۹/۶ ± ۰/۲۴	۱۳/۵ ± ۰/۴۱	۱۶/۶۷ ± ۰/۴۷	۱۸/۶۷ ± ۰/۴۷	۳۰	۰
عصاره آبی	۱/۵ ± ۰/۴۱	۵ ± ۰/۰۰	۴/۵ ± ۰/۷۱	۵ ± ۰/۰۰	۳۰	۰

*(SE) standard error، کنترل مثبت: ایمیپنم (۱۰ میکروگرم)، کنترل منفی: دی متیل سولفوکسید ۱۰۰٪

نتایج حاصل از سه بار تکرار آزمایش فنوتیپی انتشار از چاهک برای هر سه عصاره اتانولی، متانولی و آبی جلبک نشان داد که بیشترین هاله ممانعت از رشد برای عصاره اتانولی در غلظت‌های ۰/۱، ۰/۱۵، ۰/۲ و ۰/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ترتیب ۱۰/۳۳، ۱۷/۶۷، ۲۱/۶۷ و ۲۵ میلی‌متر و برای عصاره متانولی به ترتیب ۸/۳۳، ۱۵، ۱۵/۶۷ و ۱۷ میلی‌متر بود. این میزان برای عصاره آبی ۱/۶۷، ۵/۳۳، ۱۰/۳۳ و ۱۳/۳۳ میلی‌متر بود (جدول ۳). بیشترین هاله ممانعت از رشد برای عصاره اتانولی درمنه کوهی در روش انتشار از چاهک در غلظت‌های ۰/۱، ۰/۱۵، ۰/۲ و ۰/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر به ترتیب ۱۰/۳۳، ۱۳/۶۷، ۲۳/۳۳ و ۲۳ میلی متر و برای عصاره متانولی به ترتیب ۱/۳۳، ۱۵، ۱۵/۶۷ و ۱۷ میلی متر بود. همچنین این میزان برای عصاره آبی ۱/۶۶، ۵/۳۳، ۱۰/۳۳ و ۱۳/۳۳ میلی متر بود (جدول ۴).

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-04-27]

[DOI: 10.52547/sjku.25.4.124]

جدول ۳. میانگین و انحراف استاندارد (Mean±Se) قطر هاله ممانعت از رشد (میلی متر) غلظت‌های مختلف عصاره‌های الکلی و آبی (میلی گرم بر میلی‌لیتر) جلبک سبز-آبی اسپیرولینا بر *کلبسیلا پنومونیه* در روش انتشار از چاهک

غلظت / عصاره	۰/۱	۰/۱۵	۰/۲	۰/۲۵	ایمیپنم	دی متیل سولفوکسید
عصاره اتانولی	۱۰/۳۳ ± ۰/۹۴	۱۷/۶۷ ± ۲/۰۵	۲۱/۶۷ ± ۲/۳۵	۲۵ ± ۰.۰	۳۰	۰
عصاره متانولی	۸/۳۳ ± ۰/۴۷	۱۵ ± ۰/۰	۱۵/۶۷ ± ۱/۲۵	۱۷ ± ۱/۴۱	۳۰	۰
عصاره آبی	۱/۶۷ ± ۰/۹۴	۵/۳۳ ± ۰/۴۷	۱۰/۳۳ ± ۰/۴۷	۱۳/۳۳ ± ۱/۶۹	۳۰	۰

*standard error (SE)، کنترل مثبت: ایمیپنم (۱۲۸ میکروگرم بر میکرولیتر)، کنترل منفی: دی متیل سولفوکسید ۱۰۰٪

جدول ۴. میانگین و انحراف استاندارد (Mean±Se) قطر هاله ممانعت از رشد (میلی متر) غلظت‌های مختلف عصاره‌های الکلی و آبی (میلی گرم بر میلی‌لیتر) درمنه کوهی بر *کلبسیلا پنومونیه* در روش انتشار از چاهک

غلظت / عصاره	۰/۱	۰/۱۵	۰/۲	۰/۲۵	ایمیپنم	دی متیل سولفوکسید
عصاره اتانولی	۱۰/۳۳ ± ۰/۹۲	۱۳/۶۷ ± ۲/۰۵	۲۳/۳۳ ± ۲/۳۶	۲۳ ± ۲/۸۳	۳۰	۰
عصاره متانولی	۱/۳۳ ± ۰/۴۷	۱۵ ± ۰/۰	۱۵/۶۷ ± ۱/۲۵	۱۷ ± ۱/۴۱	۳۰	۰
عصاره آبی	۱/۶۶ ± ۰/۹۴	۵/۳۳ ± ۰/۴۷	۱۰/۳۳ ± ۰/۴۷	۱۳/۳۳ ± ۱/۶۹	۳۰	۰

*standard error (SE)،کنترل مثبت: ایمیپنم (۱۲۸ میکروگرم بر میکرولیتر)، کنترل منفی: دی متیل سولفوکسید ۱۰۰٪

نتایج حاصل از تعیین حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد و کشندگی در آزمایش میکرودایلشن نشان داد که این میزان برای عصاره‌های اتانولی و متانولی جلبک سبز-آبی اسپیرولینا بر *کلبسیلا پنومونیه* با مقاومت دارویی چندگانه به ترتیب ۰/۱۵ و ۰/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. عصاره آبی جلبک اثر ضد باکتریایی نداشت. همچنین کمترین غلظت ممانعت کنندگی از رشد عصاره‌های اتانولی، متانولی و آبی درمنه کوهی بر *کلبسیلا پنومونیه* با مقاومت دارویی چندگانه به ترتیب ۰/۱۵، ۰/۲۵ و ۰/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. کمترین غلظت کشندگی عصاره‌های اتانولی، متانولی و آبی روی این باکتری برای هر سه نوع عصاره ۰/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود.

با توجه به نتایج حاصل از آزمون آنالیز واریانس با اندازه های مکرر، متغیرهای عصاره و روش انتشار از دیسک یا چاهک دارای اثر معنی‌داری بر میانگین قطر هاله ممانعت از رشد ناشی از عصاره اتانولی نبود؛ ولی قطر هاله ممانعت از رشد اطراف باکتری با میزان غلظت عصاره‌های گیاه درمنه و جلبک رابطه مستقیم داشت و بالا رفتن غلظت اندازه قطر هاله بیشتر شد (P= ۰/۰۰۰۱) (جدول ۵). مقایسه‌های دوتایی آزمون بنفرونی ثابت کرد که اختلاف معنی‌داری در میان میانگین‌های هاله ممانعت از رشد در اثر بکارگیری عصاره اتانولی در غلظت ۰/۲۵ با غلظت ۰/۱۵ و ۰/۱ وجود داشت (P= ۰/۰۰۰) و همچنین میانگین هاله عدم رشد ناشی از عصاره اتانولی در غلظت ۰/۱ با غلظت ۰/۲ و ۰/۱۵ دارای تفاوت معنی‌دار بود (P= ۰/۰۰۰).

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-04-27]

[DOI: 10.52547/sjku.25.4.124]

جدول ۵. آزمون آنالیز واریانس با اندازه‌های مکرر برای عصاره اتانولی

متغیر	مقدار آماره	درجه آزادی	P-value
میزان غلظت عصاره (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	۲۲/۸۹۱	۳	۰/۰۰۰۱
عصاره (جلبک-درمنه)	۰/۰۷۶	۱	۰/۷۸۷
روش انتشار (دیسک-چاهک)	۰/۹۸۷	۱	۰/۳۳۷

در مورد عصاره متانولی نیز روش انتشار و نوع عصاره دارای اثر معنی داری بر قطر هاله نبود؛ ولی میزان غلظت دارای اثر معنی‌داری بر میانگین قطر هاله بود (P= ۰/۰۰۰۱) (جدول ۶). در آزمون بنفرونی تفاوت معنی‌داری بین میانگین هاله ممانعت از رشد برای عصاره متانولی در غلظت ۰/۲۵ با غلظت ۰/۱۵ و ۰/۱ وجود داشت (P= ۰/۰۰۰) و همچنین میانگین هاله عدم رشد در غلظت ۰/۱ با غلظت ۰/۲ و ۰/۱۵ دارای تفاوت معنی‌دار بود (P= ۰/۰۰۰).

جدول ۶. آزمون آنالیز واریانس با اندازه‌های مکرر برای عصاره متانولی

متغیر	مقدار آماره	درجه آزادی	P-value
میزان غلظت (میلی گرم بر میلی‌لیتر)	۱۲۰/۴۸	۳	۰/۰۰۰۱
نوع عصاره (جلبک-درمنه)	۰/۰۳۰	۱	۰/۸۶۵
روش انتشار (دیسک-چاهک)	۰/۰۳۰	۱	۰/۸۶۵

همچنین متغیرهای میزان غلظت، نوع عصاره و روش انتشار اثر معنی‌داری بر میانگین هاله ممانعت از رشد ناشی از عصاره آبی نداشت (P= ۰/۰۰۲) (جدول ۷). آزمون بنفرونی برای غلظت‌های عصاره آبی نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین میانگین هاله ممانعت از رشد ناشی از عصاره آبی در غلظت ۰/۲۵ با غلظت ۰/۱ وجود داشت (P= ۰/۰۰۱) و همچنین میانگین هاله عصاره آبی در غلظت ۰/۱ با غلظت ۰/۲ دارای تفاوت معنی‌دار بود (P= ۰/۰۰۱).

جدول ۷. آزمون آنالیز واریانس با اندازه‌های مکرر برای عصاره آبی

متغیر	مقدار آماره	درجه آزادی	P-value
میزان غلظت (میلی گرم بر میلی‌لیتر)	۸/۲۸۶	۳	۰/۰۰۲
نوع عصاره (جلبک-درمنه)	۰/۲۴۶	۱	۰/۶۲۸
روش انتشار (دیسک-چاهک)	۱/۹۸۵	۱	۰/۱۸۳

بحث

تأثیر گیاهان بر عوامل عفونی از دیرباز در مناطق مختلف جهان مورد توجه پژوهشگران و مردم عادی بوده است که اثر بسیاری از آن‌ها در آزمایش‌ها نیز تأیید شده است. ترکیبات گیاهی به علت داشتن ترکیبات شیمیایی و اجزا فعال بیولوژیک طبیعی برای درمان بیماری‌های عفونی و غیرعفونی می‌توانند مورد استفاده قرار گیرند(۲۷). نتایج حاصل از مطالعه حاضر اثر ضد باکتریایی عصاره آبی و الکلی درمنه کوهی و جلبک سبز-آبی اسپیرولینا بر باکتری *کلبسیلا پنومونیه* با مقاومت دارویی چندگانه را نشان داد. در این مطالعه سویه دارای مقاومت دارویی چند گانه به جنتامایسین، آمیکاسین، کولیستین، نالیدیکسیک اسید و سفتازیدیم مقاوم بود. Kiani-Abari و همکارانش (۲۰۱۵) در ایران نشان دادند که سویه‌های *کلبسیلا پنومونیه* جدا شده از بیماران به ترتیب به کوتریماکسازول (۵۸/۱ درصد)، سفالوتین (۵۲/۹ درصد)، تتراسایکلین(۴۷/۸ درصد)،

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-04-27]

[DOI: 10.52547/sjku.25.4.124]

سفوتاکسیم (۳۹/۷ درصد)، جنتامایسین (۳۶/۸ درصد)، نیتروفورانتوئین و کلرآمفینیکل (هر کدام ۲۵/۷ درصد)، آمیکاسین (۲۱/۳ درصد)، نورفلوکساسین (۱۱/۸ درصد)، نالیدیکسیک اسید (۱۹/۹ درصد)، سیپروفلوکساسین و ایمی پنم (هرکدام ۹/۶ درصد) مقاوم و از کل ۱۳۶ ایزوله، ۸۱ نمونه (۵۹/۶ درصد) دارای مقاومت دارویی چندگانه بودند(۲۸). میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی با توجه به عوامل مختلف مانند تغییرات ژنتیکی باکتری‌ها و انتقال ژن‌های مقاومت از یک باکتری به باکتری دیگر، ظهور گونه‌های مقاوم و تفاوت‌های الگو مصرف آنتی‌بیوتیک در مکان‌های مختلف، رعایت اصول بهداشتی و چگونگی تجویز منطقی آنتی‌بیوتیک‌ها به وجود می‌آید و این تفاوت‌ها می‌تواند علت بروز میزان متفاوتی از شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی در مطالعات مختلف باشد(۳۰، ۲۹). در مطالعه ما نتایج حاصل از تعیین حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد و کشندگی آنتی‌بیوتیک‌ها بر *کلبسیلا پنومونیه* نشان داد که مطلوب‌ترین حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد و کشندگی باکتری ۱ میکروگرم بر میکرولیتر بود که مربوط به آنتی‌بیوتیک نالیدیکسیک اسید بود. در مطالعه‌ای که Heydari و همکارانش (۲۰۱۵) در ایران انجام دادند، نتایج حاصل از روش تعیین حداقل غلظت کشندگی به روش میکرودایلشن نشان داد که این میزان به ترتیب برای باکتری *کلبسیلا پنومونیه* برای آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین، سفالوتین، سفتازیدیم و سیپروفلوکساسین برای سویه‌های مختلف این باکتری متفاوت و به ترتیب از ۲۵۶-۰، ۰، ۰، ۵۱۲-۰ میکروگرم بر میکرولیتر متغیر بود. این میزان در تعیین حداقل غلظت ممانعت از رشد به ترتیب برای این آنتی‌بیوتیک‌ها ۲۵۶-۰، ۳۲-۰، ۱، ۵۱۲-۰ میکروگرم بر میکرولیتر متغیر بود(۳۱). مصرف بی رویه آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان عفونت‌هایی که این باکتری عامل آن است علت اصلی به وجود آمدن سویه‌های *کلبسیلا پنومونیه* مقاوم به چند دارو است. شیوع جهانی باکتری‌های مقاوم که از جامعه و بیماران جدا شده علت نگرانی جهانی است(۳۲، ۲۶). این مشکل علت افزایش میزان مرگ و میر در بیماران بستری و افزایش هزینه‌های درمان می‌گردد. امروزه یافتن یک داروی طبیعی یا شیمیایی مناسب که جایگزین برای درمان آنتی-بیوتیکی عفونت‌ها باشد و کمترین عوارض جانبی و ایجاد مقاومت را به دنبال داشته باشد بسیار مورد توجه محققان قرار گرفته است(۳۱).

در مطالعه حاضر اثر ضد باکتریایی عصاره‌های درمنه کوهی بر باکتری *کلبسیلا پنومونیه* با مقاومت دارویی چندگانه ثابت شد. در تحقیقی که توسط Naghsh و همکاران (۲۰۱۵) در ایران با عنوان بررسی اثر ضد باکتریایی اسانس گل‌های درمنه بیابانی بر روی باکتری‌های بیماری‌زا انجام شد، اثر ضد میکروبی اسانس گل این گیاه بر *استافیلوکوکوس اورئوس*، *انتروکوکوس فکالیس*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *اشریشیا کلی* به روش انتشار از چاهک و تعیین حداقل غلظت ممانعت کنندگی و کشندگی به روش میکرودایلشن مورد آزمایش و تحقیق قرار گرفت. اطلاعات حاصل از این مطالعه ثابت کرد که که اسانس گل‌های این گیاه بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس*، *انتروکوکوس فکالیس* و *اشریشیا کلی* اثر مهار کنندگی رشد دارد. محدوده قطر هاله عدم رشد در روش چاهک ۴۵-۸/۵ میلی‌متر بود و نسبت مستقیم با غلظت داشت (در غلظت‌های بالاتر هاله عدم رشد قطر بیشتری داشت). همچنین حداقل غلظت ممانعت کنندگی ۲/۵ درصد (غلظت بر حسب درصد جرمی) و حداقل غلظت کشندگی ۵ درصد (غلظت بر حسب درصد جرمی) گزارش شد. در مطالعه حاضر کمترین و بیشترین هاله ممانعت از رشد عصاره‌های درمنه کوهی در روش انتشار از چاهک ۱/۳۳ و ۲۳ میلی‌متر بود که به ترتیب مربوط به عصاره‌های آبی و اتانولی بود. این میزان از نتایج مطالعه Naghsh کمتر بود. مطلوب‌ترین میزان کمترین غلظت ممانعت کنندگی ۰/۱۵ (مربوط به عصاره اتانولی) و کشندگی تمام عصاره‌ها ۰/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود که تقریباً مشابه با مطالعه Naghsh بود(۲۴). در مطالعه دیگر، Shojaei Baghini و همکاران (۲۰۱۸) در ایران به بررسی

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-04-27]

[DOI: 10.52547/sjku.25.4.124]

فعالیت ضد باکتریایی عصاره اتانولی گیاه درمنه کوهی علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متیسیلین پرداختند. روش میکرودایلشن نشان داد که حداقل غلظت بازدارندگی از رشد ۵۱۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. در مطالعه ما، حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد *کلبسیلا پنومونیه* با مقاومت دارویی چندگانه برای عصاره اتانولی درمنه کوهی ۰/۱۵ و برای متانولی و آبی هرکدام ۰/۲۵ میلی‌گرم بر میلی-لیتر بود که از مطالعه Shojaei Baghini بیشتر بود و در نتیجه نتایج مطالعه Shojaei Baghini مطلوب‌تر بود(۳۳). Guan و همکاران (۲۰۱۹) در چین نشان دادند که اثر ضد باکتریایی اسانس درمنه چینی به روش انتشار از دیسک روی *باسیلوس سوبتلیس* ۱۵/۱۵، *پروتئوس ولگاریس* ۱۵/۸، *اشریشیا کلی* ۱۴/۷۸، *سالمونلا انتریتیکا* ۱۳/۹۵، *لیستریا مونوسیتوژنز* ۱۳/۴۳ و *استافیلوکوکوس اورئوس* ۱۳/۲۳ میلی‌متر بود. روش میکرودایلشن نشان داد که حداقل غلظت ممانعت کنندگی عصاره درمنه چینی روی این باکتری ها ۶/۲۵ میکرولیتر بر میلی‌لیتر بود. بیشترین هاله ممانعت از رشد در تحقیق ما برای عصاره اتانولی، متانولی و آبی به ترتیب در روش انتشار از دیسک ۲۵/۶۷، ۱۸/۶۷ و ۵ میلی‌متر بود که در غلظت ۰/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مشاهده شدند که در مورد عصاره‌های اتانولی و آبی از نتایج مطالعه Guan و همکاران بیشتر بود(۳۴). مطالعات نشان داده است که گیاه درمنه به علت داشتن الکل‌های منوترپان، ۸ و ۱- سینول و کامفور باعث مهار میکروارگانیسم‌ها می‌شود. از طرفی خاصیت آب گریزی عصاره‌های گیاهی باعث پیوند روی لایه لیپیدی غشاء سلولی باکتری‌ها و میتوکندری باعث پاره شدن غشاء و نهایتاً لیز و مرگ باکتری شوند. بین ترکیبات پلی فنولیک و اثر ضد میکروبی گیاهان ارتباط وجود دارد. تعداد و جایگاه فنول در ترکیبات فنولی و همچنین نوع و میزان این ترکیبات فیتوشیمیایی متفاوت است و این به نوبه خود روی میزان و قدرت میکروب‌کشی آن ها مؤثر و یکی از دلایل اثرات متفاوت ضد میکروبی در مطالعات مختلف است. از طرفی، عصاره‌های جنس‌های یک گونه گیاه ممکن است مشابه و یا متفاوت باشد و روی انواع میکروارگانیسم‌ها نیز اثرات متفاوتی بگذارد(۳۵، ۲۷). همچنین در مطالعه حاضر اثر ضد *کلبسیلا پنومونیه* عصاره‌های اتانولی و متانولی جلبک سبز-آبی اسپیرولینا نیز بررسی و ثابت شد. این میزان برای عصاره‌های اتانولی و متانولی این جلبک به ترتیب ۰/۱۵ و ۰/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود.

Derakhshesh و همکاران (۲۰۱۱) در ایران به روش‌های انتشار از دیسک و تعیین حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی از رشد در آزمایشی که به روش لوله انجام شد، نشان دادند که عصاره‌های متانولی و کلروفرمی جلبک‌های دریایی لورسیا سیندریا و جلبک قهوه‌ای سارگاسوم آنگاستوفیلیوم اثرات ضد باکتریایی روی باکتری‌های گرم مثبت *استرپتوکوکوس موتانس*، *استرپتوکوکوس سالیواریس*، *استرپتوکوکوس سانگویس* و باکتریایی‌های گرم منفی *سالمونلا تیفی*، *پروتئوس ولگاریس*، *شیگلا فلکسنری* و *میکروکوکوس لوتئوس* داشتند. بیشترین تأثیر ضد باکتریایی عصاره‌های متانولی و کلروفرمی علیه باکتری گرم منفی سالمونلا تیفی با قطر هاله عدم رشد ۱۸ و ۲۰ میلی‌متر (به ترتیب) مشاهده شد. در مطالعه حاضر بیشترین قطر هاله ممانعت از رشد در اثر بکارگیری عصاره‌های اتانولی جلبک سبز-آبی اسپیرولینا که ۲۱/۶۷ میلی‌متر بود، این اندازه تقریباً مشابه با مطالعه Derakhshesh بود. حداقل غلظت مهارکنندگی در تحقیق Derakhshesh، ۳/۷۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای هر دو سویه جلبک در روش تعیین حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد مشاهده شد که از مطالعه ما (۰/۱۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای عصاره اتانولی) میزان آن بیشتر بود و در نتیجه در مطالعه ما این اندازه کمتر و مطلوب بود. بیشترین هاله ممانعت از رشد برای عصاره اتانولی، متانولی و آبی جلبک بر *کلبسیلا پنومونیه* در مطالعه ما در روش انتشار از دیسک در غلظت ۰/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد که به ترتیب ۲۱/۶۷، ۱۷ و ۸/۶۷ میلی‌متر بودند که اندازه آن از مطالعه Derakhshesh در مورد عصاره‌های اتانولی و

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-04-27]

[DOI: 10.52547/sjku.25.4.124]

متانولی بیشتر بود(۲۵). Ghaffari و همکارانش (۲۰۱۵) در ایران به روش انتشار از دیسک نشان دادند که قطر هاله ممانعت از رشد باکتری *کلبسیلا پنومونیه* در اثر بکارگیری عصاره اتیل استاتی جلبک دریایی قرمز ۱۲/۵۰ میلی‌متر بود و حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد به روش لوله ۸۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود که از مطالعه ما میزان بیشتری را نشان داد(۳۶). روش‌های مختلفی جهت استخراج و کاربرد عصاره‌های گیاهی و آزمایش‌های مختلف جهت اثبات و سنجش اثرات ضد باکتریایی بکار گرفته می‌شود که به نوبه خود می‌تواند علت تفاوت در نتایج باشد. تحقیقات نشان داده است که بعضی از میکروارگانیسم‌ها حساسیت بیشتری نسبت به مواد ضد میکروبی دارند و این تفاوت بستگی به دیواره سلولی میکروارگانیسم دارد. لیپوپلی ساکاریدهایی که در دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی وجود دارند مانع از رسیدن ترکیب‌های فعال به غشای سیتوپلاسمی باکتری‌های گرم منفی شده و آن‌ها را در مقابل مواد ضدمیکروبی مقاوم می‌کنند(۳۵). در مطالعه حاضر جهت دقت بیشتر در کار، پودر آنتی‌بیوتیک همراه با دیسک بکار برده شد. میزان حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد و کشندگی باکتری به ترتیب برای آنتی‌بیوتیک‌های آمیکاسین، جنتامایسین، نالیدیکسیک اسید، کولیستین و سفتازیدیم در مقایسه با میزان گیاهی آن کمتر بود. این مطلب نشان‌دهنده آن است که در بسیاری موارد آنتی-بیوتیک‌ها بهتر از عصاره‌های گیاهی عمل می‌کنند، اما در عین حال می‌توان از غلظت‌های بالاتر عصاره‌های گیاهی نیز جهت به دست آوردن نتایج مطلوب‌تر استفاده کرد. در روش‌های انتشار از دیسک و چاهک، قطر هاله ممانعت از رشد آنتی‌بیوتیک ایمیپنم از عصاره‌ها بیشتر بود که نماینگر این مطالب است که در این روش بکار بردن ایمیپنم بیشتر موثر بود. از محدودیت‌های این مطالعه می‌توان به موارد روبرو اشاره کرد: یافتن گیاه درمنه در مناطق مورد نظر با توجه به کوهستانی بودن و فصل سال با محدودیت همراه بود که با همکاری دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل تهیه و در دسترس پژوهشگران قرار گرفت، خرید یکسری از لوازم آزمایشگاه مانند میکروپلیت‌ها محدودیت مالی همراه بود که با همکاری اساتید محترم هیئت علمی در گروه میکروب‌شناسی برطرف شد. در انتها با توجه به اینکه اثر ضد باکتریایی عصاره‌ها، بخصوص اتانولی و متانولی در این مطالعه ثابت شد، می‌توان امیدوار بود که از عصاره‌های درمنه کوهی و جلبک سبز-آبی اسپیرولینا بتوان در آینده به عنوان جایگزین و یا مکمل این آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده کرد. مطالعات روی مدل‌های حیوانی و تحقیقات بیشتر جهت بکار بردن عصاره‌های گیاهی مورد نیاز است.

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر اثرات ضد باکتریایی عصاره های اتانولی، متانولی و آبی درمنه کوهی و جلبک سبز-آبی اسپیرولینا بر باکتر *کلبسیلا پنومونیه* با مقاومت دارویی چندگانه ثابت شد. همچنین حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد و کشندگی این عصاره‌ها از آنتی‌بیوتیک‌ها بهتر بود. بنا به نتایج به دست آمده می‌توان با تحقیقات بیشتر و درون تنی، آزمایش‌های کاربردی بیشتر را جهت استفاده از این دو گیاه در حیطه‌های بهداشتی و درمانی انجام داد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از معاونت پژوهش و فناوری و کمیته تحقیقات دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی کردستان جهت حمایت مالی و معنوی از طرح مذکور (کد کمیته اخلاق:IR.MUK.REC.۱۳۹۵/۱۷۰) تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-04-27]

[DOI: 10.52547/sjku.25.4.124]

منابع

1. Lavakhamseh H, Mohajeri P, Rouhi S, Shakib P, Ramazanzadeh R, Rasani A, et al. Multidrug-resistant *Escherichia coli* associated with classes 1 and 2 integrons isolated from patients. Chemotherapy. 2015;61(2):72–6.
2. Rezai MS, Pourmousa R, Dadashzadeh R, Ahangarkani F. Multidrug resistance pattern of bacterial agents isolated from patient with chronic sinusitis. Caspian J Intern Med. 2016;7(2):114-9.
3. Molaabaszadeh H, Hajisheikhzadeh B, Eslami K, Hamidi MD, Bahman Abadi R. Antibiotics profile of *Klebsiella pneumonia*, Araad hospital. Tehran. 2008-2010. IJIDTM. 2013;18(62):37-41.
4. Bagheri-Nesami M, Rafiei A, Eslami G, Ahangarkani F, Rezai MS, Nikkhah A, et al. Assessment of extended-spectrum β-lactamases and integrons among Enterobacteriaceae in device-associated infections: multicenter study in north of Iran. Antimicrob Resist Infect Control. 2016;5(2016):52.
5. Ellis MD, Baxendale FP. Toxicity of seven monoterpenoids to tracheal mites (Acari: Tarsonemidae) and their honey bee (Hymenoptera: Apidae) hosts when applied as fumigants. J Econ Entomol. 1997;90(5):1087–91.
6. Ashrafpour M, Rezaei H, Sefidgar A, Baradaran M, Sharifi H. Survey of the antibacterial properties of aqueous ethanolic and methanolic extraction of *Artemisia annua* around the city of Babol. SJIMU. 2015;23(6):129-41. [In Persian]
7. Gholampourazizi E, Rouhi S, Nouri B, Hassanzadeh Miandasteh SH. In vitro study of antifungal effect of walnut *(Juglans regia* L.) leaf extract on the *Malassezia furfur* fungus. SJKU. 2015;20(1):30-9. [In Persian]
8. Al-Haj NA, Mashan NI, Shamsudin MN, Mohamad H, Vairappan CS, Sekawi Z. Antibacterial activity in marine algae Eucheumadenticulatum against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes*. Res J Biol Sci. 2009;4(4):519-24.
9. Inouye S, Takizawa T, Yamaguchi H. Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. J Antimicrob Chemother. 2001;47(5):565-73.
10. Dinani NJ, Asgary A, Madani H, Naderi G, Mahzoni P. Hypocholesterolemic and antiatherosclerotic effect of *Artemisia aucheri* in hypercholesterolemic rabbits. Pakistan J Pharm Sci. 2010;23(3):321-5.
11. Arianfar M, Akbarinodehi D, Hemati K, Rostampoor M. Effects of altitude and aspect on efficiency of producing essence and phytochemical properties of *Artemisia aucheri* Boiss and *Artemisia sieberi* Besser in South Khorasan rangelands. J Rangeland. 2018;12(3):249-81. [In Persian]
12. Massry K, Ghorab A, Farouk A. Antioxidant activity and volatile components of egyptian, *Artemisia judaica*. Food Chem. 2002;79(3);331–6.
13. Hoodgar F, Nasri S, Amin G. Investigation of antinociceptive and anti-inflammatory effects of hydro-alcoholic extract of *Securigera securidaca* L.. Horizon Med Sci. 2011;17(1):12-9. [In Persian]
14. Ziaiye H, Azadbakht M, Abdollahi F, Shabankhani B. Effect of methanolic extracts of *Artemisia aucheri* Boiss, *Zataria multiflora* Boiss and *Myrtus communis* L. on *Trichomonas vaginalis* (In Vitro). J Gorgan Univ Med Sci. 2006;8(1):34-8. [In Persian]
15. Massiha A, Majid Khoshkholgh-Pahlaviani MR, Issazadeh KH, Bidarigh S, Zarrabi S. Antibacterial activity of essential oils and plant extracts of *Artemisia* (*Artemisia annua* L.) in vitro. ZJRMS. 2013;15(6):14-8.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-04-27]

[DOI: 10.52547/sjku.25.4.124]

16. Bilia AR, Santomauro F, Sacco C, Bergonzi MC, Donato R. Essential oil of *Artemisia annua* L.: an extraordinary component with numerous antimicrobial properties. Evid Based Complement Alternat Med. 2014;2014(2014):159819.
17. Gharanjik BM, Abkenar AM. The marin algae of the Sistan and Baluchestan Province, Iran. IJFS. 2000;2(2):37-49. [In Persian]
18. Garcia-Vaquero M, Lopez-Alonso M, Hayes M. Assessment of the functional properties of protein extracted from the brown seaweed *Himanthalia elongata* (Linnaeus) S. F. Gray. Food Res Int. 2017;99(Pt 3):971-97.
19. Peymani J, Gharaei A, Ghafari M, Taheri A. Evaluation of antibacterial and antifungal effects of marine algae (Gracilariaarcuata) of Chabahar Coasts, Iran. Qom Univ Med Sci. 2014;8(1):69-75. [In Persian]
20. Heidari M, Zolgharnine H, Sakhaei N, Mirzaei A, Movahedinia A. Comparisons of anti-radical and antibacterial potential among macro algae from northern coasts of the Persian Gulf. IJFS. 2015;24(2):53-64. [In Persian]
21. Manandhar S, Luitel S, Kumar Dahal R. In vitro antimicrobial activity of some medicinal plants against human pathogenic bacteria. J Trop Med. 2019;2019(2019):1895340.
22. Lashgari N, Vand Yousefi J, Siadat S D, Shahcheraghi F, Khosravi M, Vakili H, et al. Identification of bla-CTX-M β-lactamase in *Klebsiella pnumoniae* clinical isolates by polymerase chain reaction. Medical Sciences. 2014;24(3):148-52. [In Persian]
23. Nasirpour M, Yavarmanesh M, Mohhamadi Sani A, Mohamdzade Moghadam M. Antibacterial effect of aqueous extract of *Artemisia aucheri*, *Artemisia sieberi* and *Hyssopus officinalis* L. on the food borne pathogenic bacteria. FSCT. 2015;12(46):73-84. [In Persian]
24. Naghsh A, Mohammadi Sichani M, Amjad L. Antibacterial activity of the essential oil of artemisiadeserti flowers against some pathogenic bacteria. Qom Univ Med Sci. 2015;8(S1):57-64. [In Persian]
25. Derakhshesh B, Yousefzadi M, Afshar nasab M, Yeganeh V, Dashtian Nasab A. In vitro antibacterial activities of the marine Macroalgae" *Laurencia snyderiae*" and "*Sargassum angustifolium*" against human pathogens. Iran South Med J. 2011;14(1):17-22. [In Persian]
26. Saghi H, Bahador A, Khaledi A, Ataee Kachoei RA, Amiri Dastjerdi F, Esmaeili D. Antibacterial effects of *Origanum vulgare* essence against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from selected hospitals of Tehran, Iran. Avicenna J Clin Microbiol Infect. 2015;2(1):e22982.
27. Gholampourazizi I, Rouhi S, Zandi S, Kashefi H, Hassanzadeh Miandasteh S. Antifungal effect of *Melia azedarach* alcoholic and aquatic extract on *Malassezia furfur*. NHJ. 2017;1(2):7-11. [In Persian]
28. Kiani-Abari P, Zamanzad B, Gholipour A, Noormohamaddi Z. Determination and prevalence of antibiotic resistance in multi-drug resistant *Klebsiella pneumonia* in patients referred to the educational hospitals of Shahrekord in 2013. J Shahrekord Univ Med Sci. 2015;17(3):121-7. [In Persian]
29. Rezai MS, Bagheri-nesami M, Hajalibeig A, Ahangarkani F. Multidrug and cross-resistance pattern of ESBL-producing Enterobacteriaceae agents of nosocomial infections in intensive care units. J Mazandaran Univ Med Sci. 2017;26(144):39-49. [In Persian]
30. Rouhi S, Ramazanzadeh R. Prevalence of bla oxacillinase-23- and bla oxacillinase-24/40-type carbapenemases in *Pseudomonas aeruginosa* species isolated from patients with nosocomial and non-nosocomial infections in the west of Iran. Iran J of Pathol. 2018;13(3):348-56.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-04-27]

[DOI: 10.52547/sjku.25.4.124]

31. Heydari L, Kasra kermanshahi R, Feiz abadi MM. A comparison between the effects of antibiotics and cell free supernatant of *Lactobacillus* spp. on growth of ESBL positive *K. pneumoniae*. Iran J Med Microbiol. 2016;10(1):44-55.
32. Behzadnia S, Davoudi A, Rezai MS, Ahangarkani F. Nosocomial infections in pediatric population and antibiotic resistance of the causative organisms in north of Iran. Iran Red Crescent Med J. 2014;16(2):e14562.
33. Shojaei Baghini G, Akhavan Sepahi A, Rafiei Tabatabaei R, Tahvildari K. The combined effects of ethanolic extract of *Artemisia aucheri* and *Artemisia oliveriana* on biofilm genes expression of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Iran J Med Microbiol. 2018;10(6):417–23.
34. Guan X, Ge D, Li S, Huang K, Liu J, Li F. Chemical composition and antimicrobial activities of *Artemisia argyi* Lévl. et Vant essential oils extracted by simultaneous distillation-extraction, subcritical extraction and hydrodistillation. Molecules. 2019;24(3):483.
35. Taheri A, GholampourAzizi I, Hashemi M, Farhadi L, Servatyari K, Rouhi S. Inhibitory effect of aquatic and alcoholic extracts of *Artemisia sieberi* on growth of *Candida albicans*: An in vitro study. Qom Univ Med Sci. 2018;12(6):39-47. [In Persian]
36. Ghaffari M, Taheri A, Zobeidinezhad M. In vitro evaluation of antibacterial effect of ethyl acetate extract of red algae (*Gelidiella acerosa*) on some gram-positive and gram-negative bacteria. JRUMS. 2016;15(3):209-22. [In Persian].

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-04-27]

[DOI: 10.52547/sjku.25.4.124]