بررسی تاثیر مجزا و توام نانوذرات نقره و عصاره گیاه اسطوخودوس(Lavandula stoechas) بر روی تشکیل بیوفیلم حاصله از باکتری کلبسیلا پنومونیه

رضا حبیبی پور*[1]، لیلا مرادی حقگو[1]

۱) باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد همدان، دانشگا آزاد اسلامی، همدان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۱/۱۸ **تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۴/۲۸**

چکیده

مقدمه: اصطلاح بیوفیلم یا توده زیستی به سلول ها یا میکروارگانیسم های متعاملی گفته می شود که در اثر عوامل مختلف به دور یکدیگر جمع و بر روی یک سطح تثبیت شده اند. تشکیل بیوفیلم باعث افزایش مقاومت آن ها نسبت به شرایط نامساعد محیطی و بیوسایدها می شود. از راه های مقابله با بیوفیلم استفاده از ترکیبات مختلف گیاهی و نانوذرات است. هدف از مطالعه حاضر تعیین تاثیر نانوذرات نقره، عصاره هیدروالکلی شاخساره گیاه اسطوخودوس و تاثیر توام این دو در غلظت های مختلف بر روی تشکیل بیوفیلم حاصله از باکتری کلبسیلا پنومونیه می باشد.

مواد و روش ها: میزان اثر ضد بیوفیلمی و درصد کاهش بیوفیلم باکتری کلبسیلا پنومونیه در تیمارهای مجزا و توام نانوذرات نقره و عصاره هیدرالکلی اسطوخودوس در زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به روش رنگ سنجی میکروتیتر پلیت اندازه گیری شد. محتوای ترکیبات پلی فنلی عصاره اسطوخودوس نیز به روش فولین–سیوکالتو اندازه گیری شد.

یافته های پژوهش: محتوای تام ترکیبات فنلی در حدود ۱۱۳/۳ mg/g بود. در تمامی تیمارها باکتری کلبسیلا در عدم حضور تیمارها قادر به تشکیل بیوفیلم قوی بود. نتایج تحلیل واریانس سه طرفه جهت بررسی اثرهای اصلی و تقابلی عوامل نانوذرات نقره، عصاره اسطوخودوس و زمان بر میزان تشکیل بیوفیلم معنی دار بود. تیمارهای مجزای نانوذره نقره و عصاره اسطوخودوس به ترتیب با غلظت های ۱۲۵ ug/mL و ۰/۰۶۲۵ ug/mL و تیمار توام نانوذره و عصاره اسطوخودوس به ترتیب با غلظت های ۶۲/۵ ug/mL و ۰/۰۳۱۲۵ ug/mL به طور معناداری میزان تشکیل بیوفیلم باکتری را کاهش دادند.

بحث و نتیجه گیری: با افزایش زمان به دلیل تاثیرگذاری تیمارها از شدت تشکیل بیوفیلم کاسته می شود. با افزایش غلظت تیمارها میزان تشکیل بیوفیلم نیز کاهش می یابد. نتایج این تحقیق نشان دهنده اثر هم افزائی نانوذره و عصاره اسطوخودوس در کاهش میزان تشکیل بیوفیلم می باشد.

واژه های کلیدی: بیوفیلم، نانوذرات نقره، عصاره اسطوخودوس، کلبسیلا پنومونیه، الایزا

* نویسنده مسئول: گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد همدان، دانشگاه آزاد اسلامی ، همدان، ایران

Email:Habiby.reza@gmail.com

Copyright © 2018 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-01]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.3.187]

مقدمه

اصطلاح بیوفیلم یا همان توده زیستی به سلول ها یا میکروارگانیسم های متعاملی گفته می شود که در اثر عوامل مختلف به دور یکدیگر جمع و بر روی یک سطح تثبیت شده اند. سطوحی که میکروارگانیسم ها به آن متصل می شوند ممکن است بافت های نرم زنده، یا سطوح غیر زنده، مواد غوطه ور و یا ذرات خاک باشد. عموماً بیوفیلم به وسیله یک ماتریکس از مواد پلیمری خارج سلولی(EPS) با منشاء میکروبی احاطه شده اند. توانایی باکتری ها برای چسبیدن به سطوح، به ویژه در ارگانیسم های پاتوژن که از این خاصیت برای شروع بیماری استفاده می کنند به عنوان یک پدیده مهم شناخته شده است(۱).

بیوفیلم عنوان رویکردی است که بعضی از میکروارگانیسم ها از آن استفاده می‌کنند تا بتوانند خود را از اثرات و نیروهای زیان بار محیط طبیعی و بدن میزبان حفظ کرده و بدین گونه شانس بقای خود را افزایش دهند. زیرا وقتی باکتری ها تشکیل بیوفیلم می دهند مقاومت آن ها نسبت به شرایط نامساعد محیطی و بیوسایدها زیاد می شوند، از این رو مسئله بیوفیلم ها در امر پزشکی و صنعت به یک معظل تبدیل شده است(۲،۳).

بیوفیلم ها منبع عفونت های سیستمیک مقاوم به درمان مانند عفونت های مجرای ادراری، عفونت های کاتاتری، عفونت های مزمن در اندوکاردیت، عفونت های پوشش لنزهای تماسی، عفونت های گوش میانی کودکان، عفونت های دریچه قلبی و کاشت های جراحی می باشند(۷-۴، ۱).

برخی از باکتری های سازنده بیوفیلم از لحاظ پزشکی، صنعتی و... دارای اهمیت بیشتری بوده و مطالعات فراوانی بر روی آن ها صورت گرفته است. از جمله باکتری های مهم گرم مثبت می توان به استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، استافیلوکوک اورئوس، انتروکوک ها و از جمله باکتری های گرم منفی می توان به سودوموناس فاورسنس، سودوموناس آئروجینوزا، اشرشیاکلی، ویبریو کلرا، اسینتوباکتر بائومانی و کلبسیلا پنومونیه اشاره نمود(۱،۸،۹).

کلبسیلا از دسته باسیل گرم منفی، غیر متحرک و دارای کپسول پلی ساکاریدی می باشد. کلبسیلا پنومونیه پنجمین عامل شایع و عامل ۷/۵-۵ درصد کل عفونت های بیمارستانی بوده که میزان مرگ و میر ناشی از باکتریمی کلبسیلایی ۲۰ تا ۵۰درصد گزارش شده است(۱۰). در مطالعات صورت گرفته توسط اسکن تشعشع میکروسکوپ الکترونی و ریزبینی دوچشمی لیزری توانائی سویه های کلینیکی کلبسیلا پنومونیه در چسبیدن و تشکیل بیوفیلم ثابت شده است(۱۱).

تحقیقات در مورد خواص داروئی و پزشکی عصاره برگ گیاهان تیره نعنا و گونه خاصی از این تیره به نام اسطوخودوس(لاواندولا استوکاس) از اواخر دهه ۱۹۸۰ شروع شده است. جنس لاواندولا در دنیا بیش از ۳۰ گونه دارد که بومی دنیای قدیم بوده و از کیپ ورد و جزایر قناری تا منطقه مدیترانه، هند و نواحی جنوب غرب آسیا پراکنده شده است(۱۲). مشخص شده است این گیاه دارای ترکیباتی از قبیل دی ترپن ها، الکل های حلقوی، فلاونوئیدها، اسیدهای آلی مثل کارنوزیک اسید و ساپونین ها می باشد. از جمله ترکیبات شیمیایی شناخته شده مهم دیگر اسطوخودوس می توان به سینئول، لینالول، روغن های فرار، تانن، اسانس، استات لینالیل، کامفور، گرانیول و... اشاره نمود(۱۳).

در دهه های اخیر مطالعات زیادی در روی مواد انتقالی به ویژه نانوذرات فلزات گرانبها در رژیم نانویی به عمل آمده است. نانوذرات فلزی با خواص حد واسط مواد بالک و مولکول ها، خواص شیمیایی، اپتیکی، کاتالیزوری و الکترونیکی جالبی از خود نشان می دهند که به طور قابل توجهی از مترادف آن ها در فلزات کپه ای متفاوت می باشد. بنا بر این به جرات می توان گفت که فناوری نانو از جمله دستاوردهای شگرف علمی می باشد(۳،۱۴). نانومواد در چرخه حیات و اکوسیستم، پایین ترین سطح سمیت را از خود نشان داده اند لذا استفاده از این مواد برای مبارزه با میکروب های بیماری زا می تواند انتخاب مناسبی باشد. در مطالعات صورت گرفته ثابت شده است که نانوذراتی چون نقره(Ag)، تیتانیوم(Ti)، روی(Zn)، کروم(Cr) و

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-01]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.3.187]

اکسید آن ها خاصیت باکتری کشی بالایی دارند(۱۵،۱۶). تشکیل کلنی، رشد سلول باکتری و تشکیل ماتریکس های بیوفیلمی فشرده میکروبی و مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری ها را در مقابل سیستم دفاعی میزبان مقاوم می کند؛ اما نانوذرات از تشکیل این عوامل دفاعی میکروب در برابر سیستم ایمنی میزبان جلوگیری می کنند پس می توانند گزینه بسیار مناسبی برای مهار و از بین بردن این باکتری ها باشند(۳). هدف این تحقیق تعیین اثر بازدارندگی نانوذرات نقره و عصاره هیدروالکلی شاخساره گیاه اسطوخودوس به صورت مجزا و توام در غلظت های مختلف بر تشکیل بیوفیلم باکتری کلبسیلا پنومونیه می باشد.

مواد و روش ها

باکتری و محیط کشت مورد استفاده: باکتری مورد استفاده در این تحقیق باکتری کلبسیلا پنومونیه به صورت لیوفیلیزه شده با کد ۱۲۹۰ (NCTC 5056) از مرکز کلکسیون قارچ ها و باکتری سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران خریداری گردید. باکتری تحت شرایط استریل و طبق دستورالعمل کشت گردید.

نمونه برداری، عصاره گیری و تهیه محلول عصاره با غلظت های متفاوت از گیاه: برای انجام آزمایش های مد نظر از شاخساره گیاه اسطوخودوس گلخانه دانشگاه آزاد اسلامی واحد همدان در اردیبهشت ماه سال ۱۳۹۴ نمونه برداری شد.

شاخساره گیاه اسطوخودوس با آب شسته شده، سپس به مدت ۲ روز در آون(Memmert، مدل UNB 500، ساخت آلمان) در درجه حرارت ۵۰ درجه سانتیگراد خشک گردید. شاخساره های خشک شده با دستگاه آسیاب برقی رو میزی(ناسیونال، ساخت ژاپن) به طور کامل پودر گردید.

به منظور تهیه عصاره هیدروالکلی ۵۰ گرم از پودر شاخساره های خشک شده به مدت ۷۲ ساعت در ۵۰۰ میلی لیتر الکل اتانول ۷۰ درصد(مرک آلمان) در دمای اتاق خیسانده شد. سپس به منظور جداسازی کامل ذرات ریز معلق پودر از عصاره، سانتریفیوژ(Hettich، مدل Universal 320R، ساخت آلمان) به مدت ۱۰ دقیقه در ۴۰۰۰ دور در دقیقه در ۴ درجه سانتیگراد انجام گرفت. جهت تغلیظ و خشک نمودن عصاره ها ابتدا تمامی نمونه ها با کمک دستگاه تبخیرکننده در خلا چرخشی در فشار پائین(Heidolph، مدل LABOROTA Digital 4003 ساخت آلمان) و دمای ۴۰ درجه سانتیگراد تا حد ممکن تغلیظ گردید. سپس برای به دست آوردن پودر، عصاره های حاصله به دستگاه آون منتقل و در درجه حرارت ۴۰ درجه سانتیگراد به طور کامل خشک گردید. با استفاده از محاسبات نسبتی محلول عصاره با غلظت های ۰/۲۵، ۰/۱۲۵، ۰/۰۶۲۵ و ۰/۰۳۱۲۵ گرم در میلی لیتر با آب دو بار تقطیر استریل تهیه گردید.

اندازه گیری مقدار کل ترکیبات فنلیک و رسم منحنی استاندارد: برای تعیین میزان کل پلی فنل های موجود در عصاره اسطوخودوس از روش فولین–سیوکالتو فنل(سیگما آلدریچ، آمریکا) استفاده شد. به طور خلاصه مقدار ۴۰۰ میکرو لیتر از عصاره درون یک لوله آزمایش حاوی ۲ میلی لیتر معرف فولین–سیوکالتو که با آب به نسبت ۱۰:۱ رقیق شده بود و ۱/۶ میلی لیتر محلول کربنات سدیم ۷/۵ درصد(مرک، آلمان) ریخته و مخلوط گردید. نمونه ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شده و سپس مقدار جذب محلول با دستگاه اسپکترفتومتر(PG Instrument، مدل $T80^+$، ساخت انگلستان) در طول موج ۷۶۵ نانومتر خوانده شد(۱۷). هم چنین غلظت های ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰، ۳۰۰ و ۵۰۰ میلی گرم در لیتر(ug/mL) از تانیک اسید (مرک، آلمان) به عنوان محلول های استاندارد در آب مقطر ساخته شد. رابطه بین غلظت و جذب در ۷۶۵ نانومتر با کمک نرم افزار Excel vol.2003 به صورت معادله درجه اول(رگرسیون خطی) محاسبه گردید. از فرمول خطی به دست آمده برای محاسبه میزان کل فنلیک عصاره استفاده شد.

نانوذرات نقره: نانوذره مورد استفاده به صورت استوک ۱۰۰۰ ug/mL به روش کاهش شیمیائی تهیه شد. متوسط قطر اندازه ذرات در حدود ۵۰–۲۰ نانومتر با سطح استاندارد و خلوص ۹۹/۹ درصد بود که در فرایند تهیه آن از پلیمر پلی وینیل پیرولیدین به عنوان ماده تثبیت کننده استفاده شده بود(۱۸). به منظور

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-01]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.3.187]

بررسی روند تشکیل نانوذرات نقره در فواصل زمانی طیف جذبی اسپکتروسکوپی و ابعاد نانوذرات به ترتیب از دستگاه های اسپکتروفتومتر(PG Instrument, T +80، انگلستان) و میکروسکوپ الکترونی(TEM) استفاده شد. غلظت های مختلف نانوذرات با استفاده از محاسبات نسبتی رقیق سازی با آب غلظت های ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ug/mL ۱۰۰۰تهیه گردید.

بررسی تاثیر جداگانه و توام عصاره هیدروالکلی شاخساره گیاه اسطوخودوس و نانوذرات نقره برروی تشکیل بیوفیلم: اندازه گیری میزان تاثیر ضد بیوفیلمی جداگانه و توام عصاره هیدروالکلی شاخساره گیاه اسطوخودوس و نانوذرات نقره به روش میکروتیتر پلیت و رنگ سنجی با کریستال ویوله انجام شد(۱). به این صورت که ابتدا ۱۸۰ میکرولیتر از محیط کشت تریپتیک سوی براث(TSB)(مرک، آلمان) داخل چاهک های میکروتیترپلیت ۹۶ چاهکی از جنس پلی استایرن(JETBIOFIL، ته صاف از نوع Tissue Culture Treated) ریخته شد. در سه چاهک اول محیط کشت بدون عصاره و نانوذرات نقره بود که به عنوان شاهد مثبت در نظر گرفته شد. در چاهک تیمارهای مجزا ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت های مختلف عصاره هیدروالکلی شاخساره گیاه اسطوخودوس و یا نانوذرات نقره(در سه تکرار) به محیط کشت اضافه گردید. هم چنین در چاهک تیمارهای توام ۵۰ میکرولیتر از غلظت های مختلف عصاره هیدروالکلی شاخساره گیاه اسطوخودوس به همراه ۵۰ میکرولیتر از غلظت های مختلف نانوذرات نقره(در سه تکرار) به محیط کشت اضافه گردید. سه چاهک هم به عنوان شاهد منفی بدون عصاره و باکتری در نظر گرفته شد. از کشت ۲۴ ساعته باکتری کلبسیلا معادل نیم مک فارلند تهیه شد و ۲۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون به همه چاهک ها به جز چاهک های شاهد منفی اضافه گردید.

بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت گرماگذاری در ۳۷ درجه سانتیگراد در انکوباتور(Memmert، مدل INB 500، ساخت آلمان) محتویات داخل چاهک ها به آرامی با برگرداندن خالی شده و تمامی چاهک ها سه بار با بافر فسفات شسته شدند. میکروتیترپلیت در دمای اتاق خشک گردید. سپس با اضافه کردن ۲۰۰ میکرولیتر متانول به هرچاهک بیوفیلم باکتریایی تثبیت شد. بعد از ۱۵ دقیقه متانول چاهک ها را دور ریخته و پلیت در درجه حرارت اتاق خشک گردید. برای رنگ آمیزی به هر چاهک ۱۵۰ میکرولیتر کریستال ویوله ۰/۱ درصد به مدت ۵ دقیقه اضافه شد. سپس رنگ اضافی به طور کامل توسط جریان ملایم آب شسته شد و میکروتیترپلیت در دمای اتاق خشک گردید. بعد از این مرحله به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر استیک اسید گلاسیال ۳۳ درصد اضافه شد. پس از یکنواخت شدن محلول با عمل پیپت کردن، میزان جذب در ۶۳۰ نانومتر توسط دستگاه الایزا ریدر(Bio Tek، مدل Elx 800، ساخت امریکا) قرائت گردید.

سنجش میزان تشکیل بیوفیلم: وضعیت تشکیل بیوفیلم در چاهک ها نیز طبق فرمول زیر محاسبه گردید که در آن ODC میانگین جذب نوری چاهک های کنترل(چاهک های فاقد باکتری و عصاره یا نانوذرات) و ODT میانگین جذب نوری چاهک های تیمار می باشد(۱۹):

OD=4>(ODC×قدرت تشکیل بیوفیلم قوی)

2≤OD>(4×ODC)=(ODC×قدرت تشکیل بیوفیلم متوسط)

(2×ODC)≤OD>ODC=قدرت تشکیل بیوفیلم ضعیف

OD≤ODC=عدم تشکیل بیوفیلم

سنجش درصد کاهش تشکیل بیوفیلم: سنجش کارایی ترکیب ضد میکروبی یا درصد کاهش بیوفیلم را می توان از طریق جذب نوری چاهک های تیمار شده، کنترل و شاهد با توجه به رابطه زیر محاسبه نمود که در این رابطه ODC میانگین جذب نوری چاهک های کنترل، ODB میانگین جذب نوری چاهک های شاهد و ODT میانگین جذب نوری چاهک های تیمار شده است(۷).

درصد کاهش میزان بیوفیلم =[((ODC-ODB)-(ODT-ODB))/(ODC-ODB)]×۱۰۰

آنالیزهای آماری: در واقع به طور خلاصه طرح را می توان به عنوان یک طرح ۶×۵×۳ بین آزمودنی یا کاملاً تصادفی شده، توصیف نمود. از آزمون تعقیبی دانکن جهت مقایسه دوبدوی میانگین میزان تشکیل بیوفیلم در عوامل نانوذره، عصاره اسطوخودوس وزمان ماند استفاده شد. تجزیه و تحلیل آماری داده های به

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-01]

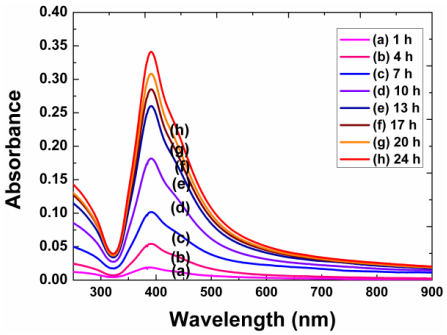
[DOI: 10.29252/sjimu.26.3.187]

دست آمده حاصل از قرائت دستگاه الایزا در طول موج ۶۳۰ نانومتر(سه تکرار از هر تیمار) با نرم افزار R و MINITAB در سطح P<0.05 انجام شد.

یافته های پژوهش

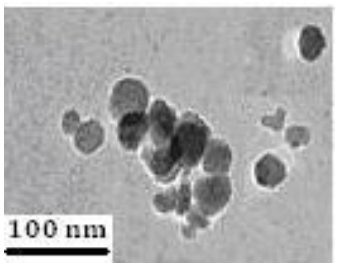
اندازه گیری مقدار کل ترکیبات فنلیک: پس از ترسیم منحنی و معادله به دست آمده بر اساس محلول استاندارد تانیک اسید برای اندازه گیری محتوای مواد فنلیکی رابطه خطی بسیار خوبی بین غلظت و جذب (R2 = 0.9893) مشاهده گردید. با استفاده از منحنی و معادله استاندارد محتوای تام ترکیبات فنلی محاسبه گردید که در حدود ۱۱۳/۳ mg/g در هر گرم پودر عصاره خشک بود.

خصوصیات نانوذرات نقره سنتز شده: شکل شماره ۱ طیف جذبی UV-Vis به دست آمده در فواصل زمانی مختلف پس از مخلوط کردن محلول آبی AgNO3 با محلول آبی نشاسته در ۵۰ درجه سانتیگراد را نشان می دهد. تشکیل نانوذرات نقره در محلول کلوییدی با کمک طیف جذبی پایش شد. روند کاهش یون های نقره با استفاده از نشاسته کند بود، که در یک ساعت وال واکنش منتج به یک باند جذبی گسترده در حدود ۴۰۰ نانومتر گردید. با افزایش زمان شدت باند واکنش سیستماتیک تشکیل نانوذرات نقره افزایش یافت و پس از حدود ۲۴ ساعت به حداکثر رسید. پس از آن، شدت باند تغییری نکرد. کاهش یون های نقره با پلیمر پلی وینیل پیرولیدین به عنوان ماده تثبیت کننده منجر به تشکیل نانوذرات نقره می شود که برای چند ماه در محلول پایدار است.



شکل شماره ۱. طیف جذبی UV-vis پس از افزودن محلول AgNO3 به محلول نشاسته در ۵۰ درجه سانتیگراد

تصویر TEM از نانوذرات نقره در شکل شماره ۲ نشان داده شده است. نانوذرات نقره با توزیع نسبتاً گسترده اندازه ذرات(محدوده ۲۰–۵۰ نانومتر) مشاهده شد.



شکل شماره ۲. تصویر TEM نانوذرات نقره

تحلیل واریانس اثر عصاره هیدروالکلی شاخساره گیاه اسطوخودوس و نانوذرات نقره برروی تشکیل بیوفیلم: نتایج بررسی اثرهای اصلی و تقابلی عوامل عصاره اسطوخودوس، نانوذره نقره و زمان ماند بر میزان

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-01]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.3.187]

تشکیل بیوفیلم باکتری کلبسیلا پنومونیه نشان داد که هر یک از فاکتورهای مذکور دارای اثر معنی دار می باشند.

نوع و درصد کاهش بیوفیلم تشکیل شده در تیمارهای جداگانه نانوذرات نقره و عصاره هیدروالکلی شاخساره گیاه اسطوخودوس: نتایج آنالیز نوع بیوفیلم و میزان کاهش درصد بیوفیلم تشکیل شده در تیمارهای جداگانه نانوذرات نقره و عصاره هیدروالکلی شاخساره گیاه اسطوخودوس در زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در جدول شماره ۱ آورده شده است. نتایج این جداول به خوبی نمایانگر تاثیر مثبت تیمارهای اعمال شده در کاهش میزان بیوفیلم متشکله می باشد.

جدول شماره ۱. نتایج آنالیز نوع بیوفیلم تشکیل شده در تیمارهای جداگانه نانوذرات نقره و عصاره هیدروالکلی شاخساره گیاه اسطوخودوس در زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت

تیمارهای مجزا	۲۴ ساعت		۴۸ ساعت		۷۲ ساعت	
	نوع بیوفیلم	درصد کاهش بیوفیلم	نوع بیوفیلم	درصد کاهش بیوفیلم	نوع بیوفیلم	درصد کاهش بیوفیلم
کنترل مثبت (غلظت صفر)	SB	۰	SB	۰	SB	۰
Ag NP 62.5 ug/mL	MB	۵۲	SB	۱۰	MB	۷۱
Ag NP 125 ug/mL	WB	۸۲	MB	۶۷	MB	۸۷
Ag NP 250 ug/mL	WB	۹۳	WB	۹۷	NB	۱۰۰
Ag NP 500 ug/mL	WB	۹۷	NB	۱۰۰	NB	۹۸
Ag NP 1000 ug/mL	WB	۹۶	NB	۹۸	NB	۱۰۰
LSE 0.03125 (g/mL)	MB	۵۲	MB	۸۰	WB	۹۲
LSE 0.0625 (g/mL)	WB	۸۰	WB	۸۸	WB	۹۴
LSE 0.125 (g/mL)	WB	۸۹	WB	۹۱	WB	۹۷
LSE 0.25 (g/mL)	WB	۹۱	NB	۱۰۰	NB	۱۰۰

AgNP: نانوذرات نقره، LSE: عصاره هیدروالکلی شاخساره گیاه اسطوخودوس، NB: عدم تشکیل بیوفیلم، WB: بیوفیلم ضعیف، MB: بیوفیلم متوسط و SB: بیوفیلم قوی

با توجه به جدول فوق رابطه $P\cong 0<\alpha=0.01$ به دست آمد، بنا بر این اثر غلظت نانوذره نقره، عصاره اسطوخودوس و زمان بر میزان تشکیل بیوفیلم در باکتری کلبسیلا پنومونیه، درسطح خطای ۱ درصد معنادار می باشد. هم چنین به دلیل این که بنا بر نظر کوهن(۱۹۸۶)، چنان چه مقدار $\eta^2 > 0.16$، اثر اصلی عامل یا اثر تقابلی عوامل بر متغیر وابسته یا پاسخ شدید می باشد(۲۰).

با توجه به میانگین های حاصل از نتایج آزمایشات می توان گفت که استفاده از غلظت ۰/۰۳۱۲۵ ug/mL قادر به کنترل متوسط تشکیل بیوفیلم بوده و غلظت های بالاتر عصاره اسطوخودوس به طور معناداری منجر به کاهش میزان تشکیل بیوفیلم باکتری می شود، هر چند این تیمار در تمامی غلظت ها تاثیر معنی داری داشته است. علاوه بر این زمان ماند بالاتر نیز به طور معناداری منجر به کاهش میزان تشکیل بیوفیلم باکتری می شود.

هم چنین از سوی دیگر با توجه به میانگین های حاصله در این تحقیق از آن جا که $\bar{x}_{125} = 0.07404 < \bar{x}_0 = 0.113$ می باشد، استفاده از نانوذره نقره با غلظت ۱۲۵ ug/mL به طور معناداری در سطح خطای ۵ درصد منجر به کاهش تشکیل میزان بیوفیلم باکتری در مقایسه با گروه کنترل شده است. در مورد مقایسه غلظت های دیگر نانوذره ۲۵۰ ug/mL، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ در سطح خطای ۵ درصد کاهش بسیاری در میزان تشکیل بیوفیلم باکتری و ممانعت از تشکیل بیوفیلم در مقایسه با گروه کنترل مشاهده می شود. اما این سه غلظت نسبت به هم اختلاف معناداری نداشتند. این نتایج در نوع بیوفیلم تشکیل شده نیز مشهود می باشد. اثر زمان ماند هم در این تیمارها معنی دار می باشد. نتایج آنالیز نوع بیوفیلم تشکیل شده در تیمارهای توام نانوذرات نقره و عصاره هیدروالکلی شاخساره گیاه اسطوخودوس در زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در جدول شماره ۲ آورده شده است.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-01]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.3.187]

جدول شماره ۲. نتایج آنالیز نوع بیوفیلم در تیمارهای توام نانوذرات نقره و عصاره هیدروالکلی شاخساره گیاه اسطوخودوس در زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت

تیمارهای توام	۲۴ ساعت		۴۸ ساعت		۷۲ ساعت	
	نوع بیوفیلم	درصد کاهش بیوفیلم	نوع بیوفیلم	درصد کاهش بیوفیلم	نوع بیوفیلم	درصد کاهش بیوفیلم
کنترل مثبت (غلظت صفر)	SB	۰	SB	۰	SB	۰
Ag NP 62.5 ug/mL - LSE 0.03125 (g/mL)	MB	۳۸	WB	۸۹	WB	۹۱
Ag NP 62.5 ug/mL - LSE 0.0625 (g/mL)	SW	۱۷	WB	۹۸	NB	۱۰۰
Ag NP 62.5 ug/mL - LSE 0.125 (g/mL)	MB	۶۵	NB	۱۰۰	NB	۱۰۰
Ag NP 62.5 ug/mL - LSE 0.25 (g/mL)	WB	۹۳	NB	۹۹	NB	۱۰۰
Ag NP 125 ug/mL - LSE 0.03125 (g/mL)	MB	۷۷	WB	۹۱	WB	۹۴
Ag NP 125 ug/mL - LSE 0.0625 (g/mL)	WB	۸۰	NB	۱۰۰	WB	۹۷
Ag NP 125 ug/mL - LSE 0.125 (g/mL)	WB	۸۹	NB	۱۰۰	NB	۱۰۰
Ag NP 125 ug/mL - LSE 0.25 (g/mL)	WB	۹۷	NB	۱۰۰	NB	۱۰۰
Ag NP 250 ug/mL - LSE 0.03125 (g/mL)	WB	۸۴	WB	۹۷	NB	۹۸
Ag NP 250 ug/mL - LSE 0.0625 (g/mL)	WB	۸۶	NB	۱۰۰	NB	۱۰۰
Ag NP 250 ug/mL - LSE 0.125 (g/mL)	WB	۹۴	NB	۱۰۰	NB	۱۰۰
Ag NP 250 ug/mL - LSE 0.25 (g/mL)	NB	۹۸	NB	۱۰۰	NB	۱۰۰
Ag NP 500 ug/mL - LSE 0.03125 (g/mL)	WB	۸۹	NB	۱۰۰	NB	۱۰۰
Ag NP 500 ug/mL - LSE 0.0625 (g/mL)	WB	۸۹	NB	۱۰۰	NB	۱۰۰
Ag NP 500 ug/mL - LSE 0.125 (g/mL)	WB	۸۹	NB	۱۰۰	NB	۱۰۰
Ag NP 500 ug/mL - LSE 0.25 (g/mL)	WB	۸۹	NB	۹۹	NB	۱۰۰
Ag NP 1000 ug/mL - LSE 0.03125 (g/mL)	WB	۹۵	NB	۱۰۰	NB	۱۰۰
Ag NP 1000 ug/mL - LSE 0.0625 (g/mL)	WB	۹۶	NB	۱۰۰	NB	۱۰۰
Ag NP 1000 ug/mL - LSE 0.125 (g/mL)	WB	۹۶	NB	۹۹	NB	۱۰۰
Ag NP 1000 ug/mL - LSE 0.25 (g/mL)	WB	۹۱	NB	۹۸	NB	۱۰۰

با توجه به نتایج از آن جا که $P\cong 0<\alpha=0.01$ شد، اثر تقابلی عوامل نانوذره، عصاره اسطوخودوس و زمان ماند بر میزان تشکیل بیوفیلم در باکتری کلبسیلا پنومونیه شدید می باشد.

مقایسه دوبدوی سطوح اصلی و تقابلی عوامل بر میزان بیوفیلم باکتری کلبسیلا پنومونیه با توجه به میانگین های حاصله از آن جا که

$\bar{x}_{N(62.5ug/mL):L(0.125ug/mL)} = ,07689 > \bar{x}_{N(62.5ug/mL):L(0.25ug/mL)} = 0.05833$

استفاده هم زمان از نانوذره و عصاره اسطوخودوس به ترتیب با غلظت های ۶۲/۵ ug/mL و ۰/۲۵ ug/mL، به طور معناداری میزان تشکیل بیوفیلم باکتری را نسبت به استفاده مجزای نانوذره نقره و عصاره اسطوخودوس بترتیب با غلظت های ۶۲/۵ ug/mL و ۰/۰۳۱۲۵ ug/mL، کاهش می دهد.

در نتیجه بررسی متوسط میزان تشکیل بیوفیلم در ترکیب سطوح مختلف عوامل نانوذره و زمان ماند به صورت دوبدو مشاهده شد که

$\bar{x}_{N(62.5ug/mL):T(72hr)} = 0.07053 > \bar{x}_{N(1000ug/mL):T(48hr)} = 0.05460$

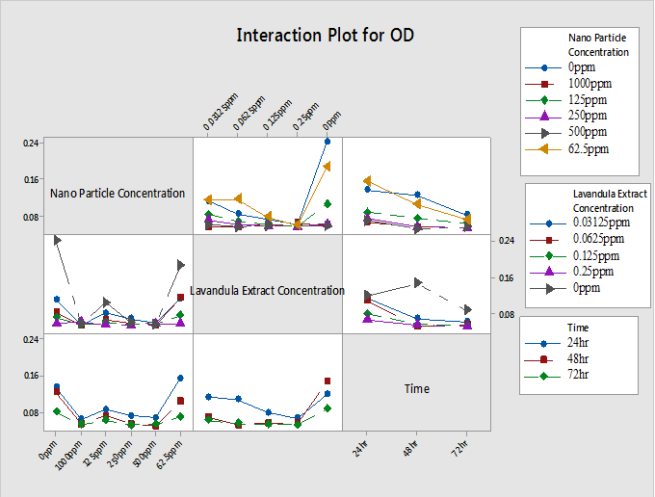
می باشد. از مهم ترین نتایج حاصله می توان به این مطلب اشاره نمود که میزان تشکیل بیوفیلم باکتری در استفاده از نانوذره با غلظت ۶۲/۵ ug/mL زمان ماند ۷۲ ساعت، به طور معناداری بیشتر از زمانی بود که از نانوذره با غلظت ۱۰۰۰ ug/mL و زمان ماند ۴۸ ساعت استفاده شد.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-01]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.3.187]

نتایج مقایسات دوبدوی متوسط میزان تشکیل بیوفیلم در ترکیب سطوح مختلف عوامل عصاره اسطوخودوس و زمان ماند نشان داد که $\bar{x}_{L(0.125ug/mL):T(48hr)} = .05761 < \bar{x}_{L(0.25ug/mL):T(24hr)} = 0.06689$ می باشد. میزان تشکیل بیوفیلم باکتری در استفاده از عصاره اسطوخودوس با غلظت ۰/۱۲۵ ug/mL و زمان ماند ۴۸ ساعت، به طور معناداری کمتر از زمانی بود که از عصاره اسطوخودوس با غلظت ۰/۲۵ ug/mL و زمان ماند ۲۴ ساعت استفاده شد.

نمودار شماره ۱ با استفاده از نرم افزار MINITAB نشان دهنده خلاصه تمامی حالات ممکن در ترکیب سطوح اثرهای تقابلی عوامل نانوذره، عصاره اسطوخودوس و زمان ماند بر میزان تشکیل بیوفیلم می باشد.



نمودار شماره ۱. بررسی اثرهای تقابلی عوامل نانوذره، عصاره اسطوخودوس و زمان ماند

بحث و نتیجه گیری

نتایج مطالعات روبو و همکاران بر روی گونه های مختلف اسطوخودوس(لاواندولا هیبریدا، لاوندولا آنگوستی فولیا اس پی پی آنگوستی فولیا، لاوندولا آنگوستی فولیا اس پی پی پیرنائیکا، لاوندولا آنگوستی فولیا کولتیوار مونستئاد و کولتیوار هیدیکوت بلو) مشخص کرده است که عصاره های حاصل از پودرهای سرگل خشک گیاهان حاوی حدود ۷۴/۹۸ تا ۸۹/۸۸ mg/gr مواد فنلیکی بوده اند(۱۴).

اسپیریدون و همکاران نیز مقدار محتوای ترکیبات فنلی را ۵۴/۹ mg GA/g گزارش کرده اند(۲۱) میزان ترکیبات فنلی گیاه اسطوخودوس در مقایسه نتیجه حاصل از این پژوهش که در آن میزان ترکیبات فنلی معادل ۱۱۳/۳ mg/g پودر عصاره خشک بود با اعداد گزارش شده فوق، کمی بیشتر می باشد. تغییر در مقدار فنلی را می توان به عوامل بسیاری از جمله نوع گونه، شیوه های زراعی، سطح بلوغ در برداشت، ذخیره سازی پس از برداشت، آب و هوایی، جغرافیایی، بخش گیاهی مورد استفاده و حتی فرایند استخراج در آزمایشگاه نسبت داد.

نتایج این تحقیق نشان داد که عصاره هیدروالکلی شاخساره گیاه اسطوخودوس در غلظت ۰/۰۶۲۵ g/mL بیوفیلم ضعیفی تشکیل شده است و با افزایش غلظت میزان تشکیل بیوفیلم کاهش بیشتری یافته است. نتایج آنالیز درصد بازدارندگی تشکیل بیوفیلم نیز به میزان زیادی در همین غلظت کاهش داشته است. با گذشت زمان نیز مشاهده شد که این روند ادامه دار بوده است. این امر با از بین رفتن باکتری ها در اثر تاثیرگذاری رو به افزایش تیمارهای انجام شده توجیه پذیر می باشد. با توجه به محتوای زیاد ترکیبات پلی فنلی در

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-01]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.3.187]

اسطوخودوس و هم چنین قدرت آنتی اکسیدانی و زدایش رادیکال های آزاد اثبات شده بسیار بالای ترکیبات فوق می توان این گونه استنباط نمود که این ترکیبات در از بین بردن باکتری و ممانعت از تشکیل بیوفیلم دارای نقش موثری باشند که در تحقیق حاضر نیز می توان آن را مشاهده نمود(۱۴،۲۱).

گالیک اسید، پروتوکاتچیوتیک اسید، ۳ و ۴ دی هیدروکسی بنزآلدئید، ۴-هیدروکسی بنزوئیک اسید، وانیلیک اسید، سیرینجیک اسید، کافئیک اسید، ۴-هیدروکسی بنزآلدئید، وانیلین، پی کوماریک اسید، فرولیک اسید، سیناپیک اسید، سینامیک اسید، ۲-اُ-گلوکوزیل کوماریک اسید، اُ-کوماریک اسید، رزمارینیک اسید، آپی جنین ۷-اُ-گلوکوزاید، کومارین، هرنیارین و لوتئولین از جمله ترکیبات فنلی شناسائی شده در روش های مختلف استخراج ترکیبات فنلی از گیاه اسطوخودوس بوده است(۱۳،۲۴-۲۲). ترکیبات گیاهی از راه های مختلفی می توانند بیوفیلم را مهار کنند؛ گیاهانی که عصاره آن ها برای باکتری ها خاصیت کشندگی یا مهارکنندگی رشد دارد باعث مهار یا کاهش تشکیل بیوفیلم باکتریایی می شود. اما برخی از ترکیبات گیاهی بدون کشتن یا مهار رشد باکتری روی بیوفیلم تاثیر می گذارد. مزیت این ترکیبات این است که باکتری ها به آن ها مقاوم نمی شوند. به عنوان مثال برخی از ترکیبات گیاهی با سیستم حد نصاب که بیوفیلم باکتریایی را کنترل می کند، تداخل ایجاد می کنند. چنان چه ثابت شده است که عصاره اتانولی گیاه ملیا دوبیا از خانواده درختان سنجد تلخ یک ترکیب ضد بیوفیلمی بوده و از طریق تداخل و مهار سیستم حد نصاب در باکتری اشریشیاکلی باعث مهار بیوفیلم این باکتری شده است(۲۲).

حبیبی پور و همکاران گزارش نموده اند که میزان بیوفیلم تشکیل شده در تیمار با عصاره پوست انار با افزایش غلظت میزان تشکیل بیوفیلم کاهش می یابد که این نتایج منطبق بر نتیجه حاصله می باشد(۲۵).

کوئنی و همکاران در سال ۲۰۱۲ در یک مطالعه پنج گونه گیاهی دارای خاصیت ضد بیوفیلمی را معرفی کردند. غلظت تحت MIC گیاهان رودیولا کرنولاتا، اپیمدیوم برویکورنوم و علف هفت بند ژاپنی توانایی مهار بیوفیلم باکتری پروپیونی باکتریوم آکنس داشتند. ماده موثره این گیاهان که باعث ایجاد خاصیت ضد بیوفیلمی در آن ها شد به ترتیب رزوراتول، ایکارین و سالیدروسید بودند(۲۶).

نانوذره نقره نیز در غلظت ۱۲۵ ug/mL در تیمار ۲۴ ساعته قادر به ممانعت از تشکیل بیوفیلم بوده، در حالی که در تیمارهای ۴۸ و ۷۲ ساعت این غلظت به ۲۵۰ ug/mL افزایش یافته است و پس از این غلظت ها روند کاهشی در تشکیل بیوفیلم مشاهده شده است. مکانیسم عمل نانونقره به این صورت است که تنفس سلولی در حضور غلظت های مختلف نانوذرات نقره در گروه های مختلف باکتریایی یک الگوی مشابه را مطرح می کنند و آن کاهش تدریجی میزان تنفس سلولی به موازات افزایش غلظت نانو نقره است تا این که در غلظت MIC برای هر باکتری، میزان تنفس به پایین ترین حد خود می رسد(۲۷). با توجه به این که در مدت زمان ۲۴ ساعت احتمالاً تعدادی از باکتری ها زنده مانده و بیوفیلم ضعیفی تشکیل شود وجود دارد بنا بر این دلیل کاهش تاثیرگذاری غلظت ۱۲۵ ug/mL در تیمارهای ۴۸ و ۷۲ ساعت می توان این مسئله باشد. این روند در کاهش درصد بیوفیلم نیز کاملاً مشهود است.

در پژوهش انجام شده توسط حبیبی پور و همکاران بر روی خواص ضدمیکروبی نانوذرات نقره در حذف باکتری اشریشیاکلی جدا شده از پساب صنعتی مشخص گردید که با افزایش غلظت، میزان فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات نقره بیشتر شده و تعداد کلنی ها کاهش می یابد. هر چند هیچ یک از غلظت ها قادر به مهار و حذف کامل باکتری ها نبوده و بر پایه نوع باکتری گر چه اثر، متفاوت بود ولی این تفاوت به لحاظ آماری معنی دار نبود که این نتیجه موید این نظریه می باشد(۲۸).

نتایج به دست آمده از تعیین خاصیت ضد باکتریایی نانوذرات نقره نشان داد که بین غلظت نانوذرات و درصد حذف باکتری ارتباط مستقیم وجود دارد. نانوذرات موجب پراکسیداسیون ترکیبات فسفولیپیدی چند حلقه ای غشاء لیپیدی باکتری های اشریشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس می شود و در نتیجه

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-01]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.3.187]

یکپارچگی غشاء سلولی کاهش یافته و فعالیت های اساسی در ساختار سلولی سالم از جمله فعالیت های تنفسی از بین رفته و مرگ سلولی غیر قابل اجتناب می شود(۲۷).

در حال حاضر، مکانیسم دقیق سمیت شناخته شده نیست. تحقیقات متعدد، مبتنی بر واکنش های احتمالی بین نانوذرات با ماکرومولکول های موجودات زنده انجام گرفته است. اختلاف بین بار منفی میکروارگانیسم و بار مثبت نانوذره، به صورت یک الکترومغناطیس جاذب بین میکروب و نانوذره عمل کرده و باعث اتصال نانوذره به سطح سلول شده و در نتیجه می تواند باعث مرگ سلول شود. در نهایت تعداد زیادی از این تماس ها منجر به اکسید شدن مولکول های سطحی میکروب ها و مرگ سریع آن ها می شوند. سمیت عنصر نقره نانوذرات در نتیجه آزاد شدن یون های نقره در محلول می باشد. نقره به حالت های اکسیداسیون مختلف، از جمله عنصر نقره(Ag^{0})، یون تک ظرفیتی نقره(Ag^{+} (رایج ترین حالت اکسیداسیون)) و حالات اکسیداسیون بالاتر(Ag^{2+} و Ag^{3+}). یون Ag^{+} با اتصال به DNA و گروه های تیول و با غیر فعال سازی آنزیم های حیاتی و تاثیر بر روی سیستم تنفس باکتری برای سلول های باکتریایی سمیت ایجاد می کند(۳،۲۷،۲۹).

لی و همکاران در سال ۲۰۱۰ تحقیقی با عنوان «مکانیزم فعالیت ضد باکتری نانونقره روی اشریشیاکلی» انجام دادند. نتایج نشان داد نانوذرات نقره می تواند نشت قندهای در حال کاهش را از سیتوپلاسم باکتری تسریع نماید و به طور مشابهی نانوذرات نقره نشت پروتئین ها از طریق غشاء اشرشیاکلی را افزایش داد. فعالیت دهیدروژناز زنجیره تنفسی در سلول های کنترل مثبت با زمان کشت افزایش یافت، در حالی که فعالیت دهیدروژناز زنجیره تنفسی تقریباً هیچ تغییری در سلول های کنترل منفی اشرشیاکلی که به مدت ۲۰ دقیقه جوشیده بود، نداشت. فعالیت آنزیمی با افزایش زمان کشت به سرعت کاهش یافت. نتایج نهایی تحقیق لی در خصوص فعالیت ضد باکتری نانونقره روی اشرشیاکلی با نتایج به دست آمده از این تحقیق مطابقت دارد(۱۶).

در مقایسات بین تیمارهای توام اعمال شده نیز روندی تقریباً مشابه روند توضیح داده شده در فوق حکم فرماست. در زمان ۲۴ ساعت تیمار توام غلظت ۱۲۵ ug/mL نانوذره با غلظت ۰/۰۶۲۵ ug/mL عصاره اسطوخودوس و غلظت های بالاتر تشکیل بیوفیلم بسیار ضعیف بوده است. از نظر کاهش درصد بیوفیلم نیز مشاهده می شود که در این غلظت ها در تیمار ۲۴ ساعته نیز کاهش قابل ملاحظه ای در درصد بیوفیلم رخ داده است. در زمان های ۴۸ و ۷۲ ساعت نیز هیچ گونه بیوفیلمی مشاهده نشده که معادل حذف تقریباً صد در صدی بیوفیلم می باشد. در مقایسه با نتایج تیمارهای جداگانه مشاهده می شود که بین نانوذره نقره و عصاره اسطوخودوس رابطه هم افزائی وجود داشته است.

در تحقیقات متعددی رابطه هم افزائی بین آنتی بیوتیک ها، نانوذرات و عصاره گیاهان مشاهده شده است. برای مثال در تحقیق انجام شده توسط کریچواک و همکاران مشخص شد که استفاده توام نانوذرات نقره و عصاره گیاه دروزرا بیناته بر روی بیوفیلم باکتری استافیلوکوکوس اورئوس از روند هم افزائی تبعیت می کند. مکانیسم این هم افزائی به این دلیل است که هر چند قدرت ترکیبات گیاهی در کشتن میکروارگانیسم ها قابل قبول است اما عموماً قدرت نفوذ ترکیبات ضد بیوفیلمی یا ضد باکتریایی به تنهایی ضعیف است. از سوی دیگر همان گونه که اشاره شد نانوذرات نقره به آسانی قادر به تخریب دیواره و غشای سلولی می باشند. بنا بر این در صورت استفاده توام نانوذرات و عصاره گیاهان میزان تاثیر بسیار قابل توجه خواهد بود که در این تحقیق نیز نتیجه مشابهی مشاهده شد(۳۰).

عفونت های کلبسیلای هم چنان بار سنگینی بر دوش اقتصاد و امید به زندگی بیماران در کشورهای توسعه یافته می باشد. بنا بر این، پیشرفت بیشتر در پیشگیری از عفونت های بیمارستانی، مستلزم رویکردهای جدید برای کنترل عفونت است. از نتایج تحقیق حاضر می توان پی برد که کارایی غلظت های مختلف نانوذرات نقره و عصاره هیدروالکلی شاخساره گیاه اسطوخودوس بسته به توان آن ها در برداشتن

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-01]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.3.187]

بیوفیلم از سطوح و کشتن باکتری های درون بیوفیلم متفاوت می باشد. البته حذف کامل بیوفیلم تنها با این تیمارها به دست نمی آید، حتی اگر آن عامل مورد استفاده در مقابل سلول های پلانکتونیک بسیار موثر باشد، بنا بر این برای حذف کامل بیوفیلم بر روی سطوح دستگاه ها، تجهیزات پزشکی، محیط کارخانه های تولیدی و اماکن بهداشتی بهتر است از ترکیب چندین ضد عفونی کننده و به طور هم زمان اما در زمان مناسب که همان اوایل تشکیل بیوفیلم می باشد استفاده گردد.

آزمایشات انجام شده در این تحقیق نشان دادند که با افزایش زمان به دلیل از بین رفتن باکتری ها در اثر تاثیر تیمارهای انجام شده از شدت تشکیل بیوفیلم کاسته می شود. هم چنین با افزایش غلظت نیز میزان تشکیل بیوفیلم به میزان بیشتری کاهش می یابد. در نتایج آزمایشات استفاده توام نانوذرات نقره و عصاره هیدروالکلی شاخساره اسطوخودوس اثر هم افزائی نیز مشاهده گردید.

References

1. Otoole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. Annual Rev Microbiol 2000; 54:49-79. doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.49.

2.Allison DG, Ruiz B, SanJose C, Jaspe A, Gilbert P. Extracellular products as mediators of the formation and detachment of Pseudomonas fluorescens biofilms. FEMS Microbiol Let 1998;167:179-84. doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb13225.x.

3. Climent JA. The impacts of nanoparticles on planktonic and biofilm bacteria a thesis of doctor of philosophy school of geography. Earth Environ Sci2009;2: 1-241.

4. Kokare CR, Chakraborty S, Khopade AN, Mahadik KR. Biofilm importance and applications. Ind J of Biotech2009; 8:159-68.

5. Saaibusquiza P. Biofilm formation by listeria monocytogenes resistance to industrial biocides and crossresponse caused by adaptation to benzalkonium chloride. Earth Environ Sci2011;3:122-6.

6. Omay C, Tufenkji N. Pseudomonas aeruginosa swarming motility is blocked by cranberry proanthocyanidins and other tannin-containing materials. Appl Environ Microbiol 2011; 77:3061-7.

7. Namasivayam SK, Preethi M, Bharani AR, Robin G, Latha B. Biofilm inhibitory effect of silver nanoparticles coated catheter against Staphylococcus aureus and evaluation of its synergistic effects with antibiotics. Int J Biol Pharm Res 2012;3:259-65.

8. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin Microbiol Rev 2002;15:167-93. PMID:11932229.

9. Sharma S, Sabnis S. Study of anti adhesive properties of fruit juices and plant extracts on urinary tract pathogens. Asian J Exp Biol Sci Spl 2010;3:100-3.

10.Niveditha S, Pramodhini S, Umadevi S, Kumar S, Stephen S. The isolation and the biofilm formation of uropathogens in the patients with catheter associated urinary tract infections. JCDR2012; 6:1478. doi: 10.7860/JCDR/2012/4367.2537.

11. Vuotto C, Longo F, Balice MP, Donelli G, Varaldo PE. Antibiotic resistance related to biofilm formation in Klebsiella pneumoniae. Pathogens 2014; 3:743-58. doi: 10.3390/pathogens3030743

12. Larrondo JV, Agut M, Calvo MA. Antimicrobial activity of essences from labiates. Microbios 1995;82:171-2.

13. Mahasneh MAEL, Oqlah AA. Antimicrobial activity of herbal plants used in the traditional medicine of Jordan. J Ethnopharmacol 1999; 64:271-276. doi: 10.1016/S0378-8741(98)00132-9.

14.Robu SI, Aprotosoaie AC, Miron A, Cioanca OA, Stanescu UR, Hancianu MO. In vitro antioxidant activity of ethanolic extracts from some Lavandula species cultivated in Romania. Cell 2012;60:211-9.

15. Sosa IO, Noguez C, Barrera RG. Optical properties of metal nanoparticles with arbitrary shapes. J Phys Chem 2003;107:6269-75.
doi: 10.1021/jp0274076.

16. Li WR, Xie XB, Shi QS, Zeng HY, Yousheng OY, Chen YB. Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on Escherichia coli. Appl

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-01]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.3.187]

Microbiol Biotechnol2010 1;85:1115-22. doi: 10.1007/s00253-009-2159-5
17. Attard E. A rapid microtitre plate Folin-Ciocalteu method for the assessment of polyphenols. Open Life Sci2013 Jan 1;8:48-53. doi: 10.2478/s11535-012-0107-3.
18. Guzman MG, Dille J, Godet S. Synthesis of silver nanoparticles by chemical reduction method and their antibacterial activity. Int J Chem Mole Mate Met Eng 2008;2:91-8.
19. Nyenje ME, Green E, Ndip RN. Biofilm formation and adherence characteristics of Listeria ivanovii strains isolated from ready-to-eat foods in Alice, South Africa. The Scientific World Journal. 2012; (873909):873909 . doi: 10.1100/2012/873909.
20. Cohen A, Lo SH, Singh K. Estimating a quantile of a symmetric distribution. The Ann Stat 1985;13:1114-28. doi:10.1214/aos/1176349659.
21. Spiridon I, Bodirlau R, Teaca CA. Total phenolic content and antioxidant activity of plants used in traditional Romanian herbal medicine. Cent European J Biol2011;6:388-96. doi: https://doi.org/10.2478/s11535-011-0028-6.
22. Ravichandiran V, Shanmugam K, Anupama K, Thomas S, Princy A. Structure based virtual screening for plant derived SdiA selective ligands as potential antivirulent agents against uropathogenic Escherichia coli. European J Med Chem 2012 1;48:200-5. doi: 10.1016/j.ejmech.2011.12.015
23. Dvorackova E, Snoblova M, Hrdlicka P. Content of phenolic compounds in herbs used in the Czech Republic. Int Food Res J 2014; 21.
24.Balakrishnan A, Priya V, Gayathri R. Prelimnary phytochemical analysis and antioxidant activities of Lemongrass and Lavender. Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. 2015;7:448.
25. Habibipour R, Moradi Haghgou L. [Study on hydro alcoholic extract effect of pomegranate peel on pseudomonas aeruginosa biofilm formation]. Sci J Hamadan Uni Med Sci 2015;22:195-202. (Persian)
26.Coenye T, Brackman G, Rigole P, De Witte E, Honraet K, Rossel B, Nelis HJ. Eradication of Propionibacterium acnes biofilms by plant extracts and putative identification of icariin resveratrol and salidroside as active compounds. Phytomedicine2012;19:409-12. doi:10.1016/j.phymed.2011.10.005
27. Park HJ, Park S, Roh J, Kim S, Choi K, Yi J, Kim Y, Yoon J. Biofilm inactivating activity of silver nanoparticles a comparison with silver ions. J Ind Eng Chem2013;19:614-9. doi: 10.1016/j.jiec.2012.09.013
28. Sadeghian M, Habibipour R, Seif A. [Effect of silver nano particle on removing the Enterococcus faecalis bacterium isolated from industrial resid]. MLJGOUMS 2015; 9 :133-138. (Persian)
29. Prabhu S, Poulose EK. Silver nanoparticles mechanism of antimicrobial action synthesis medical applications and toxicity effects. Int Nano let 2012;2:32. doi.org/10.1186/2228-5326-2-32.
30. Krychowiak M, Grinholc M, Banasiuk R, Krauze M, Glod D, Kawiak A, Krolicka A. Combination of silver nanoparticles and Drosera binata extract as a possible alternative for antibiotic treatment of burn wound infections caused by resistant Staphylococcus aureus. PLos One 2014;9:115727. doi.org/10.1371/journal.pone.0115727

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-01]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.3.187]

A study on separated and combined effects of stoechas extract(Lavandula stoechas) and silver nano-particles on Klebsiella pneumoniae biofilm formation

Habibipour R[1], Moradi Haghgou L[1]*

(Received: February 6, 2017 Accepted: July 19, 2017)

Abstract

Introduction: So-called biofilm or biomass is interacting cells or microorganisms that accumulate together as a result of various factors on a surface. Biofilm formation increases resistance to unfavorable conditions and biocides. Of the strategies to deal with biofilms is using different plant compounds and nanoparticles. The aim of this study was to determine the effect of silver nanoparticles, lavender extract, and their combined effects in different concentrations on Klebsiella pneumoniae biofilm.

Materials & Methods: The anti-biofilm effect and reduced rate of biofilm formation of Klebsiella pneumoniae in separated and combined treatments of stoechas extract (Lavandula stoechas) and silver-nanoparticles at 24, 48 and 72 hours were measured by colorimetric microtiter method. Phenolic content was also measured by Folin-Ciocalteu method.

Findings: Phenolic content was about 113.3 mg/g. In the absence of treatments, Klebsiella was able to form strong biofilms. Three-way-analysis of variance of the main and interacting effects of silver nanoparticles, lavender extract and time on biofilm formation was significant. Silver nanoparticle and lavander extract at concentrations of 125 and 0.0625 ug/mL, respectively, and co-treatments at 62.5 and 0.03125 ug/mL concentrations, respectively, significantely reduced biofilm formation.

Discussion & Conclusions: By increasing time, biofilm formation reduced due to effects of treatments. Biofilm formation also reduced by increasing concentration of the treatments. The result of this survey showed that silver-nanoparticles and lavender extract have synergistic effects on reduction of biofilm formation.

Keywords: Biofilm, Silver nano-particle, Lavander extract, Klebsiella pneumoniae, ELISA

1. Yong Reserch and Eliteclub, Hamadan Branch, Islamic Azad University, Hamedan, Iran
** Corresponding author Email: Habiby.reza@gmail.co*

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-01]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.3.187]