

بررسی اثر عصاره پنیرک بر روی رشد و تشکیل بیوفیلم در سودوموناس آئروژینوزا

سرگل امین نژاد^۱، روحا کسری کرمانشاهی^{۱*}، مرتضی میرزایی^۲، جمال رشیدیانی^۳

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه الزهراء، تهران
۲. مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی بقیه الله، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران
۳. مرکز تحقیقات نانوبیوتکنولوژی بقیه الله، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران

چکیده

سابقه و هدف: سودوموناس آئروژینوزا (*Pseudomonas aeruginosa*) یک بیماری زای فرصت طلب و مهم می باشد که قادر به تولید بیوفیلم است و این بیوفیلم باکتری را در مقابل درمان با مواد شیمیایی تا حد زیادی مقاوم می کند، بنابراین مهار بیوفیلم اثر بازدارندگی بر روی مقاومت این باکتری ایجاد می کند.

مواد و روش ها: در این تحقیق اثر عصاره الکلی گیاه پنیرک (*Malva sylvestris*) بر سویه استاندارد سودوموناس آئروژینوزا ATCC: 2785 مورد مطالعه قرار گرفت. عصاره الکلی گیاه پنیرک با استفاده از دستگاه سوکسله تهیه گردید. خاصیت ضد میکروبی عصاره گیاه ابتدا با روش چاهک پلیت بررسی گردید. حداقل غلظت مهار کننده (MIC) و حداقل غلظت کشنده (MBC) آن ها با روش میکروتیتر پلیت و طبق استاندارد CLSI تعیین شد. بررسی اثر عصاره گیاه بر روی تشکیل بیوفیلم با روش میکرو تیتر پلیت اصلاح شده انجام گرفت. جهت مقایسه ارتباط داده ها از آزمون t مزدوج و آنالیز واریانس (ANOVA) استفاده شد.

یافته ها: نتایج نشان داد که این گیاه اثرهای مؤثری روی باکتری دارد که MIC و MBC با هم یکسان و برابر ۶۲/۵ mg/ml می باشد و هم چنین غلظت های مختلف از عصاره پنیرک به صورت معنی داری تولید بیوفیلم توسط سودوموناس آئروژینوزا را در مقایسه با کنترل مثبت کاهش می دهد (P value = ۰/۰۱۲۴).

بحث: با توجه به یافته های این پژوهش عصاره الکلی گیاه پنیرک اثر کشندگی چشم گیری روی بیوفیلم باکتریایی سودوموناس آئروژینوزا دارد بنابراین به نظر می رسد که این ماده طبیعی می تواند عامل امید بخشی در درمان عفونت های سودوموناسی باشد.

واژه های کلیدی: سودوموناس آئروژینوزا، MIC، MBC، بیوفیلم، پنیرک

مقدمه

بیماران دارای نقص سیستم ایمنی مانند بیماران سرطانی، مبتلایان به ایدز، افراد مبتلا به Cystic Fibrosis و سوختگی شدید به عفونت های این باکتری حساس اند و میزان مرگ و میر ناشی از این عفونت ها در این بیماران ۵۰ درصد است (۱۳). این باکتری دارای عوامل بیماری زای متعدد می باشد که مقاومت زیادی را نسبت به اکثر آنتی بیوتیک ها ایجاد کرده است که در این میان بیوفیلم در بیماری زای و مقاومت بیوساییدی باکتری سودوموناس آئروژینوزا و افزایش تراکم آنتی بیوتیکی لازم برای کشتن باکتری های بیوفیلمی نسبت به پلانکتونیک از اهمیت خاصی برخوردار است (۲). به دنبال استفاده بی رویه از آنتی بیوتیک ها و مقاومت زیاد سودوموناس آئروژینوزا به آنتی بیوتیک های رایج و ایجاد مقاومت چندگانه و هم چنین هزینه بالا و عوارض این داروها جوامع پیشرفته به فکر استفاده از منابع طبیعی هم چون گیاهان دارویی افتادند که یکی از آن ها پنیرک صحرايي با نام علمی *Malva sylvestris* می باشد که

سودوموناس آئروژینوزا باسیل گرم منفی هوازی اجباری و یک بیماری زای فرصت طلب است. این باکتری یکی از چهار عامل بیماری زای مهم بیمارستانی است که مسئول ۱۰/۱ درصد از تمام عفونت های اکتسابی بیمارستانی می باشد (۱۹).

نویسنده مسئول :

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه الزهراء، تهران
پست الکترونیکی: rkasra@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۵/۳

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۲/۲

همچنین جهت تعیین دانسیته عصاره ها، ۱۰ میلی لیتر از عصاره را در بالن ژوژه ریخته و وزن کرده و با استفاده از فرمول $d = \frac{m}{v}$ دانسیته عصاره ها را تعیین گردید که ۱/۰۷ بوده است.

تعیین اثر ضد میکروبی عصاره گیاه بر روی

سودوموناس آئروژینوزا

روش چاهک پلیت:

سوسپانسیون میکروبی معادل ۰/۵ مک فارلند از سودوموناس آئروژینوزا تهیه شد و با استفاده از سوآب استریل بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار (مرک، آلمان) به صورت چمنی کشت داده شد. سپس با پیپت پاستور استریل بر روی محیط مذکور چاهک هایی به قطر ۶ میلی متر ایجاد شد. ۱۰۰ μ l از غلظت های ۵۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر از عصاره گیاه به چاهک ها تلقیح شد و ۱۰۰ μ l از حلال DMSO به عنوان شاهد منفی در یکی از چاهک ها تلقیح شد، همچنین به دلیل حساسیت این باکتری به جنتامیسین از این آنتی بیوتیک به عنوان شاهد مثبت استفاده گردید. پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C گرماگذاری شدند. نتایج حاصل از وجود و یا عدم وجود قطر هاله عدم رشد با کولیس اندازه گیری شد و آزمایش سه بار تکرار شد (۱۰).

تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد (MIC) به

روش براث میکرودایلوشن

در این روش از پلیت های ۹۶ چاهکی (Orange) استفاده شد. غلظت های مورد نظر از عصاره گیاه با استفاده از محیط کشت مولر هینتون براث تهیه و از دامنه غلظت ۱۲۵ mg/ml تا ۰/۶۲ mg/ml استفاده گردید سپس ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت های مختلف عصاره گیاه به هر چاهک انتقال داده شد در ادامه به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری اضافه شد. در نهایت غلظت نهایی باکتری در هر چاهک به میزان $10^6 \times (1-0/5)$ CFU/ml رسید. پلیت های میکروتیتر، برای جلوگیری از تبخیر درون پلاستیکی قرار داده شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C گرماگذاری شد از روش های پیشنهادی طبق دستورالعمل CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) برای تعیین حساسیت میکروب های مورد مطالعه استفاده شد (۲۰، ۸).

تعیین کمترین غلظت کشنده (MBC) مواد ضد میکروبی به

روش کشت بر محیط جامد:

برای تعیین MBC یک لوپ از چاهک هایی که فاقد کدورت بودند و همچنین چاهک های کنترل مثبت و منفی بر سطح محیط نوترینت آگار کشت کشت داده شد. پلیت ها بعد از

گیاهی است پایا به ارتفاع ۱۰ - ۱۵ سانتی متر و ساقه های کرکدار منشعب و نیمه خوابیده. برگ های آن پنجه ای بوده و به طور متناوب بر روی شاخه قرار دارند. گل ها صورتی مایل به بنفش بوده و دارای پنج گلبرگ باریک با رگه هایی از رنگ بنفش هستند (۴).

از پنیرک به عنوان گیاهی با اثرهای مختلف یاد شده است به طور مثال منبع غنی از ویتامین های A, B, C بوده و همچنین دارای مواد لعابی، تانن ها، مواد رزینی، اگزالات کلسیم و اسانس می باشد البته مهم ترین ماده مؤثر گل های پنیرک را موسیلاژ (لعاب نباتی) تشکیل می دهد که در اثر هیدرولیز آن گالاکتوز، آرابینوز، گلوکز، رامنوز و گالاکتورونیک اسید حاصل می شود (۹، ۱۲).

به تازگی مطالعه های زیادی روی خواص ضد میکروبی تیره پنیرکیان انجام شده که فعالیت ضد میکروبی علیه بسیاری از پاتوژن انسانی را اثبات می کند (۱۸). هدف از انجام این تحقیق بررسی اثر ضد باکتریایی و ضد بیوفیلمی عصاره الکلی گیاه پنیرک صحرایی می باشد.

مواد و روش ها:

باکتری و محیط کشت:

تمام آزمایش ها بر روی سویه استاندارد سودوموناس آئروژینوزا ATCC: 27853 انجام گرفت که به صورت لیوفیلیزه از مرکز پژوهش های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. سویه مورد نظر در محیط کشت نوترینت براث (مرک، آلمان) به همراه ۱۵٪ گلیسرول در ۸۰°C نگهداری می شد و کشت مجدد آن بر روی محیط کشت مولر- هینتون آگار (مرک، آلمان) انجام شد.

تهیه عصاره الکلی گیاه

گیاه پنیرک از مناطق شمال غربی ایران جمع آوری شد و توسط بخش تحقیقات کشاورزی شناسایی و تأیید شد. گیاه در دمای مناسب و سایه خشک شد و آسیاب گردید. استخراج عصاره گیاه با استفاده از دستگاه سوکسله و حلال الکل انجام گرفت همچنین برای تهیه رقت از عصاره گیاه پنیرک از حلال دی متیل سولفو کساید ۵٪ (DMSO) استفاده شد (۱۵، ۵).

کنترل کیفی عصاره ها:

یک عامل مهم در کیفیت عصاره pH آن ها است که در اینجا با pH متر اندازه گیری شد که ۴/۳ بوده است.

α = مورد ارزیابی قرار گرفت. کل مطالعه‌های آماری با استفاده از نرم افزار Graph Pad Prism نسخه ۵ (Graph pad Software In, San Deigo, USA) انجام گرفت.

نتایج

با استفاده از روش چاهک پلیت و تأثیر عصاره الکلی پنیرک بر روی سودوموناس آئروژینوزا مشخص شد که عصاره الکلی پنیرک در غلظت ۵۰۰ میلی گرم در میلی لیتر بر روی این باکتری اثر مهاری دارد. نتایج حاصل از اندازه گیری قطر هاله های عدم رشد غلظت های مختلف عصاره های گیاهی و آنتی-بیوتیک جنتامیسین در جدول شماره ۱ آمده است.

حداقل غلظت مهار کنندگی MIC و حداقل غلظت کشندگی MBC عصاره پنیرک در برابر سودوموناس آئروژینوزا یکسان می باشد و برابر ۶۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر است.

تشکیل بیوفیلم در حضور عصاره گیاه:

بعد از خوانده شدن نتایج با دستگاه خواننده الیزا، میانگین اعداد مربوط به هر رقت و انحراف معیار آن ها به دست آمد و نمودارهای مربوط به هر کدام رسم شد. غلظت صفر نشان دهنده کنترل مثبت است.

نتایج حاصل از بررسی اثر عصاره پنیرک نشان داد که این عصاره به میزان قابل توجهی بر تشکیل بیوفیلم اثر مهار کنندگی دارد که در مقایسه با شاهد (حلال DMSO) به طور کامل معنی دار است.

با افزایش غلظت عصاره گیاه میزان بازدارندگی به صورت معنی-داری افزایش پیدا می کند، و لید بیوفیلم در حضور این عصاره در غلظت برابر MIC ، ۸۴/۵ درصد مهار می شود هم چنین غلظت های کم تر از غلظت MIC این عصاره نیز به مقدار چشم-گیری تشکیل بیوفیلم را کاهش می دهند (شکل ۲ و ۱).

گذشت ۲۴ ساعت بررسی و میزان MBC بر اساس حداقل غلظتی از ماده ضد میکروب که از رشد باکتری در سطح پلیت جلوگیری کرده بود، تعیین شد (۳).

بررسی اثر عصاره گیاه بر تولید بیوفیلم

سودوموناس آئروژینوزا :

برای بررسی تولید بیوفیلم در باکتری سودوموناس آئروژینوزا، از روش پلیت میکروتیتر اصلاح شده استفاده شد (۱۶).

باکتری مورد نظر بر روی محیط TSA به علاوه ۰/۲٪ گلوکز (مرک ، آلمان) به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ °C کشت داده شد و از تک کلنی های رشد یافته روی این محیط، به محیط TSB + ۰/۲٪ گلوکز تلقیح شد تا سوسپانسیونی با جذب نوری معادل ۰/۱ در طول موج ۶۲۵ نانومتر به دست آید. ابتدا ۱۰۰ μl از هر کدام از رقت های مواد ضد میکروبی به هر چاهک پلیت میکروتیتر افزوده شد سپس ۱۰۰ μl از سوسپانسیون باکتری و محیط کشت به هر چاهک اضافه گردید. دامنه غلظت برای عصاره گیاه ۵۰۰-۱/۹۵ (رقیق کننده DMSO) بود. به چاهک کنترل منفی ۲۰۰ μl محیط کشت TSB + ۰/۲٪ گلوکز و به چاهک کنترل مثبت ۲۰۰ μl از سوسپانسیون میکروبی و محیط کشت اضافه شد حجم کلی هر چاهک ۲۰۰ μl بود. پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ °C گرماگذاری شدند. پس از طی دوره گرماگذاری، محتوی چاهک ها به دقت و به وسیله سمپلرهای استریل آسپیره گردید. به منظور جدا شدن باکتری های متصل نشده، هر چاهک ۲-۳ مرتبه با ۲۰۰ μl بافر PBS استریل شستشو داده شد. در مرحله بعد، ۱۵۰ μl متانول مطلق (مرک، آلمان) به هر چاهک اضافه شد و پس از ۱۰ دقیقه متانول شستشو داده شد. سپس به هر چاهک ۲۰۰ μl کریستال ویوله ۱٪ اضافه گردید. پس از ۲۰ دقیقه رنگ اضافی خارج شده و پلیت در زیر جریان کم آب شسته شد. پس از خشک شدن پلیت در مجاورت هوا، به هر چاهک ۱۵۰ μl اسید استیک گلاسیال ۳۳٪ (مرک ، آلمان) افزوده شد و با استفاده از دستگاه خواننده الیزا (statfax-2100, Awareness Technology Inc., USA) جذب رنگ موجود در هر چاهک در ۶۵۰ نانومتر خوانده شد. درصد مهار تشکیل بیوفیلم با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد (۱۶).

$\{ 100 \times (OD_{650} \text{ مربوط به کنترل مثبت} / OD_{650} \text{ مربوط به بیوساید}) - 100 = \text{درصد مهار}$

محاسبات آماری:

جهت مقایسه ارتباط داده ها از آزمون t مزدوج و آنالیز واریانس (ANOVA) استفاده شد و معنا دار بودن تفاوت ها با ۰/۰۵

مشکل‌های متعددی مواجه ساخته است (۷). با توجه به اهمیتی که بیوفیلم در بیماری‌زایی و مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری سودوموناس آئروژینوزا ایفا می‌کند تلاش برای یافتن ترکیب‌های ضد میکروبی جدیدی که بتواند در تراکم کم‌تر، باکتری‌های مولد بیوفیلم را از بین ببرد یک امر ضروری به نظر می‌رسد (۲). در این میان استفاده از گیاهان دارویی یک گزینه مناسب به نظر می‌رسد. گیاهان با اثرهای ضد میکروبی با مکانیسم‌های مختلف و حتی متفاوت از آنتی‌بیوتیک رشد باکتری‌ها را مهار می‌کنند و این امر لزوم تحقیق‌های جامع‌تری در حیطه گیاهان دارویی را گوشزد می‌کند.

مطالعه‌های متعددی نشان داده است که اکثر این گیاهان فاقد اثر ضد میکروبی بر روی سودوموناس آئروژینوزا می‌باشند (۱۱)، گیاه پنیرک صحرایی به‌عنوان یک گیاهان دارویی دارای ترکیب‌های ضد میکروبی متعددی است و نتایج مطالعه‌های انجام شده بر روی خواص ضد میکروبی پنیرک حاکی از آن است که این گیاه نیز دارای فعالیت ضد باکتریایی، ضد قارچی و ضد ویروسی علیه بسیاری از پاتوژن انسانی می‌باشد. مطالعه‌های قبلی نشان داده است که مصرف این گیاه در کاهش عوارض سرماخوردگی به‌ویژه سرفه و هم‌چنین در درمان التهاب‌های تنفسی، مجاری ادراری و گوارشی و بیماری‌های پوستی و درمان برونشیت تأثیر دارند (۱۷، ۱۴).

Shanab و همکاران در سال ۲۰۰۴ اثر عصاره اتانولی و متانولی چندین گیاه دارویی از تیره پنیرکیان را با روش چاهک پلیت و Broth Micro Dilution بر استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سوبتیلیس و سودوموناس آئروژینوزا بالینی با مقاومت چندگانه آنتی‌بیوتیکی مورد بررسی قرار داد و مشاهده کردند که این تیره از گیاهان دارای اثر ضد میکروبی بر سودوموناس آئروژینوزا نبودند ولی ترکیب عصاره این گیاهان با هم اثر هم‌افزایی نشان داده است و مانع از رشد سودوموناس آئروژینوزا شده است (۱).

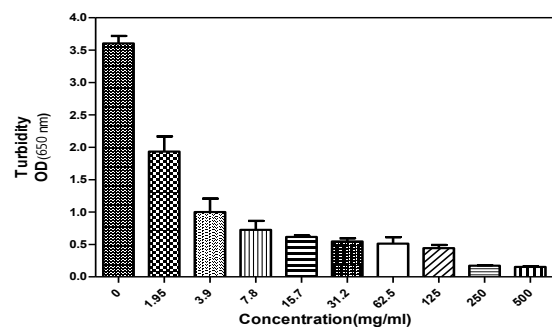
Wallter و همکاران در سال ۲۰۱۱ اثر عصاره هگزانولی برگ، ریشه و گل گیاه جمع‌آوری شده از پاکستان از جمله پنیرک را بر روی رشد تعدادی از بیماری‌زاهای گرم مثبت مانند استافیلوکوکوس اورئوس و گرم منفی مانند اشرشیاکلی و سودوموناس آئروژینوزا با روش چاهک پلت مورد بررسی قرار دادند که نشان داده شد. اثر ضد میکروبی پنیرک در مقابل گرم مثبت‌ها نسبت به گرم منفی‌ها بیش‌تر بوده است (۱۸).

نتایج به‌دست آمده در این تحقیق و بررسی‌های که سایر محققان داده‌اند ثابت می‌کند که عصاره گیاه پنیرک دارای خاصیت ضد میکروبی بر روی سودوموناس آئروژینوزا می‌باشد

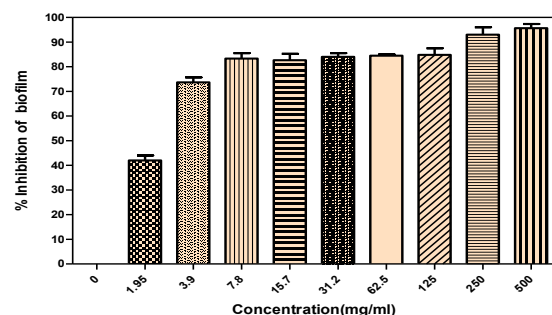
جدول ۱. میانگین قطر هاله عدم رشد در باکتری سودوموناس آئروژینوزا با غلظت‌های مختلف (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) عصاره الکی پنیرک.

شاهد (+)	شاهد (-)	غلظت عصاره الکی پنیرک (mg/ml)			مواد ضد میکروبی
		۵۰۰	۲۵۰	۵۰	
					قطر هاله عدم رشد بر حسب cm
					سودوموناس آئروژینوزا ATCC:2785 3
۱۷	±۰.۰	۱۲	±۰.۰	±۰.۰	

- شاهد منفی: 5% DMSO
- شاهد مثبت: جنتامیسین
- نتایج به صورت (X±SD) گزارش شده است. قطر ۶ mm برابر قطر هر چاهک است



شکل ۱. تأثیر عصاره الکی پنیرک بر تشکیل بیوفیلم در سودوموناس آئروژینوزا



شکل ۲. نمودار درصد مهار تشکیل بیوفیلم در سودوموناس آئروژینوزا توسط عصاره پنیرک

بحث:

سودوموناس آئروژینوزا یک بیماری‌زای فرصت‌طلب است و افزایش روز افزون مقاومت باکتری که امروزه به شکل مقاومت چندگانه در آمده است بیماران مبتلا به این باکتری را با

نتایج حاصل از این کار به طور چشم گیری مطابق با کارهای قبلی انجام شده بوده است. این تحقیق در شرایط *in vitro* انجام شده است و تا حد بسیار زیادی از تشکیل بیوفیلیم جلوگیری کرده است یکی از دلایل این بازدارندگی می تواند مربوط به وجود موسیلاژهای پلی ساکاریدی و قندهای موجود در عصاره باشد که تا حد زیادی مانع اتصال باکتری به سطوح و تشکیل بیوفیلیم می شوند. در این تحقیق بررسی در شرایط *in vivo* انجام نشده است و برای فهمیدن مکانیسم واکنش این مواد و سلول های اپی تلیال میزبان نیاز به تحقیق بیشتری می باشد.

سپاسگزاری

از مرکز تحقیقات بیولوژی ملکولی بقیه الله، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله برای تأمین تجهیزات آزمایشگاهی این پروژه تشکر و قدردانی می شود.

البته تفاوت های در قدرت بازدارندگی گیاه بررسی شده در این تحقیق نسبت به کارهای گذشته وجود دارد که می تواند به دلیل تفاوت در نوع سویه های باکتریایی مورد استفاده، هم-چنین رقم های متفاوت از گیاه که محل جمع آوری آنها با هم فرق می کرده است و هم چنین روش عصاره گیری نیز ممکن است بر روی اثر ضد میکروبی عصاره تأثیر بگذارد که باعث تفاوت های جزئی در کار ما شده است ولی در حالت کلی نتایج این تحقیق با نتایج تحقیق های گذشته مطابقت داشته است.

میانگین قطر هاله عدم رشد عصاره این گیاه در غلظت ۵۰۰ میلی گرم در میلی لیتر در مقایسه با جنتامیسین دارای تفاوت معنی داری بوده است ($P \text{ value} > 0/05$).

اگر چه قدرت بازدارندگی عصاره مورد نظر کم تر از جنتامیسین بوده است، باید به این نکته توجه داشت که این خاصیت ضد میکروبی نتیجه عصاره تام می باشد که دارای بسیاری از ترکیب های خنثی در برابر باکتری ها است که در صورت شناسایی، جداسازی و آزمایش مجدد این گیاه مطمئن اثر ضد میکروبی آن به مراتب افزایش پیدا می کند. با توجه به این فرضیه که اگر عصاره پنیرک بر روی بیوفیلیم سودوموناس گه یکی از مهم ترین فاکتورهای بیماری زایی آن است اثر بازدارندگی داشته باشد می توان به عنوان یک افزودنی در پمادهای سوختگی استفاده کرد و نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که عصاره این گیاه در غلظت های مختلف توانایی بسیار بالایی در مهار بیوفیلیم این باکتری از خود نشان می دهد.

Head در سال ۲۰۰۸ اثر چند گونه دیگر از پنیرکیان را بر عفونت های دستگاه ادراری بررسی کرد و مشاهده کرد که این گیاهان از رشد باکتری های گرم منفی دخیل در این عفونت جلوگیری می کند و هم چنین در این تحقیق اثر تعدادی از ویتامین ها و قندها بر روی عفونت های دستگاه ادراری مورد بررسی قرار گرفت است و مشخص شد مصرف سه ماهه ویتامین ث (Ascorbic Acid) بر روی کاهش عفونت در زنان دارای عفونت ادراری اثر داشته است ($P \text{ value} = 0/03$). هم-چنین استفاده هم زمان ویتامین A و مواد ضد میکروبی باعث کاهش معنی دار عفونت ادراری (UTI) در کودکان بیمار شده است. موضوع دیگری که در تحقیق ایشان مورد بررسی قرار گرفت تأثیر قند مانوز (D-mannos) بر روی قدرت اتصال بیماری زها است که محققان مشاهده کردند این قند اتصال باکتری اشرشیاکلی را به طور کامل به موکوس سلول های اپی تلیال و متوقف می کند و در نتیجه تشکیل بیوفیلیم را برای این باکتری دچار مشکل می کند (۶).

نتیجه گیری :

منابع :

1. Abu-Shanab B, ADWAN GM, Abu-Safiya D, Jarrar N, Adwan K. Antibacterial activities of some plant extracts utilized in popular medicine in Palestine. *Turk J Biol*, 2005. 2;28(2-4):p.99-102.
2. Banin E, Brady KM, Greenberg EP. Chelator-induced dispersal and killing of *Pseudomonas aeruginosa* cells in a biofilm. *Appl Env Microbiol*. 2006. 1;72(3):p.2064-9
3. Carroll KC, Jorgensen JH, Pfaller MA, editors. Manual of Clinical Microbiology. 2015.
4. Chiej R. The Macdonald encyclopedia of medicinal plants. Macdonald & Co (Publishers) Ltd; 1984.
5. Emamghoreishi M, Heidari-Hamedani G. Sedative-hypnotic activity of extracts and essential oil of coriander seeds. *Iran J Med Sci*, 2015. 9;31(1):p.22-7.
6. Head KA. Natural approaches to prevention and treatment of infections of the lower urinary tract. *Altern Med Rev*, 2008 Sep 1;13(3):p.227-45.
7. Jaffe RI, Lane JD, Bates CW. Real-time identification of *Pseudomonas aeruginosa* direct from clinical samples using a rapid extraction method and polymerase chain reaction (PCR). *J Clin Lab Ana*, 2001. 1;15(3):p.131-7.
8. Mahboubi M, Bidgoli FG. Antistaphylococcal activity of *Zataria multiflora* essential oil and its synergy with vancomycin. *Phytomedicine*, 2010. 30;17(7):p.548-50.
9. Mulyaningsih S, Sporer F, Zimmermann S, Reichling J, Wink M. Synergistic properties of the terpenoids aromadendrene and 1, 8-cineole from the essential oil of *Eucalyptus globulus* against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant pathogens. *Phytomedicine*, 2010. 30;17(13):p.1061-6.
10. Nitisinprasert S, Nilphai V, Bunyun P, Sukyai P, Doi K, Sonomoto K. Screening and identification of effective thermotolerant lactic acid bacteria producing antimicrobial activity against *Escherichia coli* and *Salmonella* sp. resistant to antibiotics. *Kasetsart J.(Nat. Sci.)*, 2000. 34:p.387-400.
11. Owlia P, Rasooli I, Saderi H. Antistreptococcal and antioxidant activity of essential oil from *Matricaria chamomilla* L. *Res J Biol Sci*, 2007. 2(2):p.237-9.
12. Pirbalouti AG, Yousefi M, Nazari H, Karimi I, Koohpayeh A. Evaluation of burn healing properties of *Arnebia euchroma* and *Malva sylvestris*. *EJ Bio*, 2009.5:p.62-6..
13. Schulert GS, Feltman H, Rabin SD, Martin CG, Battle SE, Rello J, Hauser AR. Secretion of the toxin ExoU is a marker for highly virulent *Pseudomonas aeruginosa* isolates obtained from patients with hospital-acquired pneumonia. *J Infect Dis*, 2003. 1;188(11):p.1695-706.
14. Shale TL, Stirk WA, Van Staden J. Variation in antibacterial and anti-inflammatory activity of different growth forms of *Malva parviflora* and evidence for synergism of the anti-inflammatory compounds. *J Ethnopharmacol*, 2005.4;96(1):p.325-30.
15. Souza LK, Oliveira C, Ferri PH, Oliveira Júnior JG, Souza Júnior AH, Fernandes OD, Silva MD. Antimicrobial activity of *Hyptis ovalifolia* towards dermatophytes. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2003. 98(7):p.963-5.
16. Stepanović S, Vuković D, Dakić I, Savić B, Švabić-Vlahović M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods*, 2000. 30;40(2):p.175-9.
17. Veshkurova O, Golubenko Z, Pshenichnov E, Arzanova I, Uzbekov V, Sultanova E, Salikhov S, Williams HJ, Reibenspies JH, Puckhaber LS, Stipanovic RD. Malvone A, a phytoalexin found in *Malva sylvestris* (Family Malvaceae). *Phytochemistry*, 2006. 30;67(21):p. 2376-9.
18. Walter CY, Shinwari ZK, Afzal IM, Malik RN. Antibacterial activity in herbal products used in Pakistan. *Pak J Bot*, 2011. 1;43:p.155-62.
19. Wendelboe A, Baumbach J. Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* Infections caused by a Contaminated Cystoscope. *New Mexico Epidemiology*. 2007. 6:p.1-4.

20. Zgoda JR, Porter JR. A convenient microdilution method for screening natural products against bacteria and fungi. *Pharm Biol*, 2001. 1;39(3):p.221-5.

