

## *The Antimicrobial Effect of Methanolic Extracts of Achillea wilhelmsii, Myrtus communis, and Allium sativum on Pseudomonas aeruginosa*

Mehdi Rostamirad<sup>1</sup>, Ali Javadi<sup>1</sup>, Tayebeh Akbari<sup>2</sup>, Azam Heidarpour<sup>3</sup>, Mitra Jamali<sup>4</sup>, Roya Mahdavi<sup>5\*</sup>, Mohammad Khodadad Motlagh<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Department of Medical Bacteriology, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

<sup>2</sup>Department of Medical Microbiology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

<sup>3</sup>Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Qom University of Medical Sciences, Qom, Iran.

<sup>4</sup>Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran.

<sup>5</sup>Department of Medical Immunology, Faculty of Paramedical Sciences, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran.

<sup>6</sup>Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.

\***Corresponding Author:** Roya Mahdavi, Department of Medical Immunology, Faculty of Paramedical Sciences, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran.

Email: royamahdavi986@gmail.com

Received :8 Feb, 2017

Accepted: 6 Aug, 2017

### **Abstract**

**Background and Objectives:** *Pseudomonas aeruginosa* is a Gram-negative bacterium, which has the ability to cause opportunistic infections in patients with immunodeficiency. The conditions of the patient as well as the response of infection-producing strain to treatment, can be very effective in infection progression process, so that, infectivity process leads to bacteremia and sepsis, causing a difficult situation. Increasing resistance of this bacterium has prompted researchers to discover an effective agent to suppress the pathogenicity of this pathogen. Since ancient times, herbal extracts have been used to treat various infections. In this study, the antimicrobial effect of methanolic extracts of *Achillea Wilhelmsii*, *Myrtus communis*, and *Allium sativum*, was investigated on *Pseudomonas aeruginosa*.

**Methods:** In this study, the effect of *Achillea Wilhelmsii*, *Myrtus communis*, and *Allium sativum* extracts, was investigated on 4 strains of *Pseudomonas aeruginosa*, and the effect of each extract, was studied using agar dilution method.

**Results:** Among these three extracts, the *Allium sativum* extract showed the highest antimicrobial activity. Also, observations were indicative of difference in the susceptibility of the studied strains to different extracts, which showed different reactions to each of the extracts based on the origin and antibiotic resistance level.

**Conclusion:** According to the results of this study, extracts are a natural and valuable sources to produce antimicrobial drugs against pseudomonas strains and other resistant pathogenic bacteria.

**Keywords:** *Pseudomonas aeruginosa*; Methanolic extract; *Achillea*; *Myrtus*; Garlic.

## اثر ضد میکروبی عصاره‌های متانولی بومادران، سیر و مورد بر سودوموناس آئروژینوزا

مهدی رستمی‌راد<sup>۱</sup>، علی جوادی<sup>۱</sup>، طیبه اکبری<sup>۲</sup>، اعظم حیدرپور<sup>۳</sup>، میترا جمالی<sup>۴</sup>، رؤیا مهدوی<sup>۵\*</sup>، محمد خداداد مطلق<sup>۶</sup>

### چکیده

**زمینه و هدف:** سودوموناس آئروژینوزا یک باکتری گرم منفی است که توانایی ایجاد عفونت‌های فرصت طلب در بیماران دچار ضعف سیستم ایمنی را دارد. شرایط و وضعیت بیمار، همچنین پاسخ سویه مولد عفونت نسبت به درمان می‌تواند در روند پیشرفت عفونت بسیار تأثیرگذار باشد؛ بدین شکل که روند عفونت‌زایی به سمت باکتری‌می و سپس رفته و وضعیت دشواری ایجاد می‌کند. مقاومت روزافزون این باکتری باعث شده تا محققان در پی کشف ماده‌ای مؤثر در جهت سرکوب بیماری‌زایی این پاتوژن باشند. از زمان‌های دور تاکنون، از عصاره‌های گیاهی برای درمان عفونت‌های مختلف استفاده می‌شود. در این مطالعه اثر ضد میکروبی عصاره‌های متانولی بومادران، سیر و مورد بر سودوموناس آئروژینوزا بررسی گردید.

**روش بررسی:** در این مطالعه تجربی، اثر سه عصاره بومادران، مورد و سیر بر روی چهار سویه مختلف از سودوموناس آئروژینوزا بررسی شد و تأثیر هر کدام از این عصاره‌ها به روش رقت در آگار مورد مطالعه قرار گرفت.

**یافته‌ها:** از میان سه عصاره مورد بررسی، عصاره سیر بیشترین اثر ضد میکروبی را نشان داد. همچنین مشاهدات، حاکی از تفاوت در حساسیت سویه‌های مورد بررسی نسبت به عصاره‌های مختلف بود که بر اساس خاستگاه و میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی، واکنش‌های متفاوتی نسبت به هریک از عصاره‌ها نشان دادند.

**نتیجه‌گیری:** با توجه به نتایج این مطالعه، عصاره‌ها منابع طبیعی و ارزشمندی در جهت ساخت داروهای ضد میکروبی بر علیه سودوموناس‌ها و سایر باکتری‌های بیماری‌زای مقاوم می‌باشند.

**کلید واژه‌ها:** سودوموناس آئروژینوزا؛ عصاره متانولی؛ بومادران؛ مورد؛ سیر.

<sup>۱</sup>گروه باکتری‌شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

<sup>۲</sup>گروه میکروبی‌شناسی پزشکی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

<sup>۳</sup>گروه میکروبی‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قم، قم، ایران.

<sup>۴</sup>دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران.

<sup>۵</sup>گروه ایمنی‌شناسی پزشکی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران.

<sup>۶</sup>گروه میکروبی‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.

\*نویسنده مسئول مکاتبات:

رؤیا مهدوی، گروه ایمنی‌شناسی پزشکی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:

royamahdavi1986@gmail.com

تاریخ دریافت: ۳۵/۱۱/۱۹

تاریخ پذیرش: ۹۶/۵/۱۵

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Rostamirad M, Javadi A, Akbari T, Heidarpour A, Jamali M, Mahdavi R, et al. The antimicrobial effect of methanolic extracts of *Achillea wilhelmsii*, *Myrtus communis*, and *Allium sativum* on *Pseudomonas aeruginosa*. *Qom Univ Med Sci J* 2018;11(10):70-76. [Full Text in Persian]

## مقدمه

امروزه، مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌های مختلف موجب افزایش مقاومت‌های میکروبی در مقابل این داروها شده است (۱). مشکل مقاومت دارویی به‌خصوص در مورد باکتری‌های فرصت‌طلب از جمله سودوموناس آئروژینوزا، بیش از پیش موجب افزایش نگرانی در امر سلامت عمومی شده (۲)، و این ویژگی، سودوموناس آئروژینوزا را تبدیل به یکی از عوامل تهدیدکننده زندگی افرادی که دچار بیماری‌های خاص، نقص سیستم ایمنی بدن و سایر عوارضی که باعث بستری‌شدن طولانی‌مدت آنها در محیط بیمارستان می‌شود، کرده است (۲،۱). براساس آمار اعلام‌شده از سوی سازمان NNIS (National Nosocomial Infection Surveillance System)

سال ۱۹۹۷ - ۱۹۹۲، سودوموناس آئروژینوزا در ۳٪ از عفونت‌های خونی، ۲۱٪ از پنومونی‌های بیمارستانی (شایع‌ترین باکتری)، ۱۰٪ عفونت‌های ادراری (چهارمین عامل شایع)، ۱۳٪ عفونت‌های حلق، بینی و گوش (سومین عامل شایع) و ۵٪ از عفونت‌های قلب دخیل بوده است (۴،۳). درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری، یک امر دشوار و پیچیده است؛ چراکه این باکتری نه تنها به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم است؛ بلکه توانایی کسب مقاومت در خلال درمان را نیز دارد (۶،۵). به‌طورکلی می‌توان عواملی همچون نفوذپذیری بسیار کم غشای باکتری و وجود پورین‌های موجود در این غشا و مقاومت ذاتی، وجود پمپ‌های برون‌ریز (Efflux Pump)، ایجاد موتاسیون‌های مختلف در سایت‌های هدف آنتی‌بیوتیک‌ها و ژن‌های تنظیمی مرتبط با ایجاد مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها، وجود ظرفیت ژنتیکی بالا برای بیان مکانیسم‌های متعدد مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها و کسب ژن‌های مقاوم از دیگر باکتری‌ها را مهم‌ترین مکانیسم‌ها در کسب مقاومت آنتی‌بیوتیکی به‌وسیله سودوموناس آئروژینوزا دانست (۷،۵). یکی از مهم‌ترین راهکارهای در دست بررسی جهت مبارزه با عفونت‌های ناشی از باکتری‌های مقاوم، یافتن خواص ضد میکروبی عصاره‌های گیاهی و استفاده از آنها برای درمان عفونت‌های باکتریایی، به‌خصوص در مورد باکتری‌های مقاوم به چند دارو

(Multi Drug Resistance, MDR) می‌باشد (۸).

با توجه به اینکه برخی عصاره‌های گیاهی و ترکیبات پایه‌ای آنها اثرات ضد میکروبی فوق‌العاده‌ای دارند و در درمان عفونت‌ها نیز به کار می‌روند، بومادران با نام علمی *Achillea wilhelmsii* جزء خانواده *Asteraceae*، مورد یا *Myrtus communis* در خانواده *Myricaceae* و سیر با نام علمی *Allium sativum* عضو از خانواده پیازها (*Alliaceae*)، انتخاب و تأثیر آنها در روند رشد سودوموناس آئروژینوزا مورد بررسی قرار گرفت (۹،۸).

بومادران نوعی گیاه با پراکندگی جغرافیایی گسترده بوده که گل‌ها، ساقه و برگ‌های آن خاصیت دارویی دارند. اسانس این گیاه حاوی کامازولن، سینئول و بورنتول است که دارای خاصیت ضدباکتریایی، ضدتورم و التهاب، ضداسپاسم و التیام موضعی پوست می‌باشد (۱۰).

گیاه مورد حاوی اسانس‌های ناپایداری به نام "دپانتین" و "میرنتول" است و احتمال می‌رود اثر ضد میکروبی آن نیز مربوط به وجود همین ترکیبات باشد (۱۰). خاصیت ضدباکتریایی سیر در سال ۱۸۵۸ توسط لویی پاستور مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج جالبی مبنی بر اثر این عصاره بر تعدادی از گونه‌های باکتریایی گزارش شد. اثر ضدباکتری سیر به دلیل ترکیبات شیمیایی موجود در آن مانند آلئین، اهوئین، آلیسین و آلیستائین بوده و به‌همین علت برای سرکوب رشد بسیاری از میکروب‌ها مانند باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی، قارچ‌ها، انگل‌ها و ویروس‌ها به کار می‌رود (۱۲،۱۱).

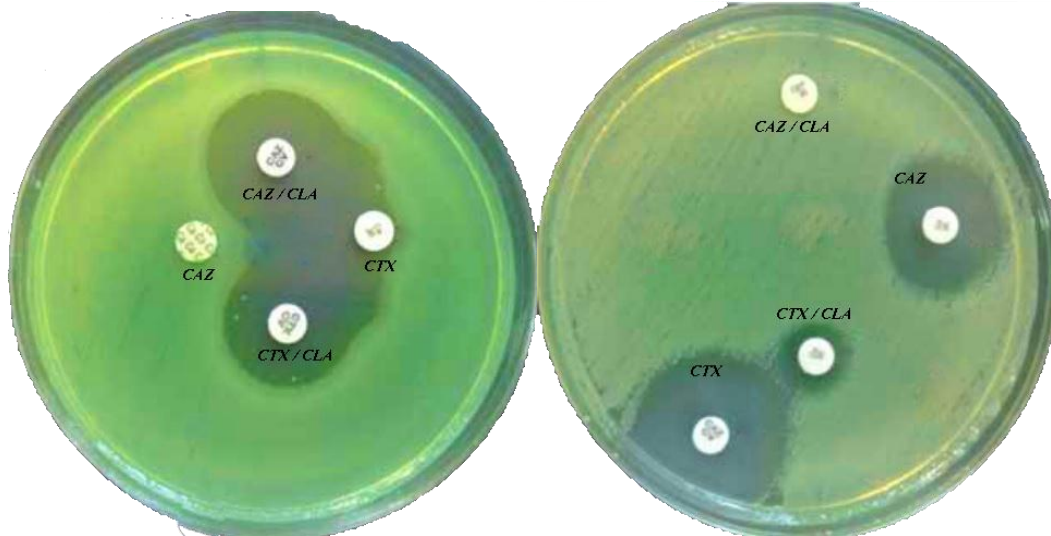
بررسی اثر عصاره‌های گیاهی مختلف بر روی باکتری‌هایی که از نظر مقاومت آنتی‌بیوتیکی حایز اهمیت باشند، می‌تواند کمک بزرگی در جهت کشف آنتی‌بیوتیک‌های جدید برای مقابله با خطر آلودگی با این باکتری‌ها باشد. پژوهش حاضر با هدف بررسی اثر سه عصاره مورد، سیر و بومادران بر رشد سودوموناس آئروژینوزا و به دست آوردن حداقل غلظت ممانعت‌کننده رشد (MIC) هر کدام از این عصاره‌ها انجام شد.

## روش بررسی

در این مطالعه تجربی، اثر سه عصاره مورد، سیر و بومادران بر ۳ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا و سویه استاندارد با شماره ATCC 27853 بررسی گردید.

پس از انکوباسیون پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت، هاله‌های عدم رشد اطراف دیسک‌های بدون کلانولانیک اسید و دیسک‌های حاوی کلانولانیک اسید با خط کش مخصوص اندازه‌گیری شد. اگر هاله عدم رشد اطراف دیسک‌های آنتی‌بیوتیک - کلانولانیک اسید از دیسک‌های آنتی‌بیوتیک خالص، ۱/۵ برابر بیشتر باشد، نشان‌دهنده تولید ESBL به وسیله این ایزوله است و در صورت کمتر بودن این تست، ایزوله فاقد ESBL خواهد بود (۱۳). شکل شماره ۱، نشان‌دهنده ایزوله ESBL مثبت بوده و شکل شماره ۲، نشان‌دهنده ایزوله ESBL منفی است.

از میان ۳ ایزوله: ۱ ایزوله دارای بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف (ESBL)، ۱ ایزوله فاقد بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف و ۱ ایزوله محیطی بود. برای تأیید تولید ESBL از روش Combined Disk، براساس خاصیت مهارى کلانولانیک اسید بر روی بتالاکتامازها استفاده شد؛ بدین صورت که پس از تهیه سوسپانسیون باکتریایی با کدورتی برابر با ۰/۵ مک‌فارلند، آن را در سطح محیط مولر هینتون آگار کشت داده، سپس دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی (محصول کمپان MAST انگلیس) شامل سفوتاکسیم (CTX) و سفوتاکسیم - کلانولانیک اسید (CTX/CLA)، همچنین دیسک‌های سفتازیدیم (CAZ) و سفتازیدیم - کلانولانیک اسید (CAZ/CLA) در فاصله ۲۰ میلی‌متری از یکدیگر قرار گرفتند.



شکل شماره ۲: ایزوله ESBL<sup>-</sup>

شکل شماره ۱: ایزوله ESBL<sup>+</sup>

CAZ: Cephtazidime; CAZ/CLA: Cephtazidime/Clavulanic Acid CTX: Cefotaxime; CTX/CLA: Cefotaxime/Clavulanic Acid

برای تعیین MIC هر یک از عصاره‌ها بر ایزوله‌ها، ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون ۰/۵ مک‌فارلند هر کدام از ایزوله‌ها بر روی محیط‌های تهیه شده (حاوی غلظت‌های مشخص از عصاره‌های مورد بررسی) تلقیح و به مدت ۱۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند و پس از گذشت این زمان، نتایج خوانده و ثبت گردید (۱۴، ۱۵).

### یافته‌ها

در این مطالعه، عصاره سیر در مجموع اثر بیشتری بر سویه‌های مختلف سودوموناس آئروژینوزا داشت و در مقابل، بومادران دارای کمترین تأثیر بر روی رشد سویه بود؛ البته در مورد سویه

جهت تهیه عصاره متانولی، ۶۰ گرم پودر گیاه خشک شده در ۳۰۰ میلی‌لیتر متانول به مدت ۸ ساعت در دستگاه سوکسله قرار داده شد. سپس مقدار ۵۰۰ میلی‌گرم از هر عصاره در ۵۰۰ میکرولیتر از حلال دی متیل سولفوکساید (DMSO) و ۱۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل حل شد. پس از انجام این فرآیند به شیوه تهیه رقت سریالی، سوسپانسیون عصاره و حلال در ۶ لوله حاوی آب مقطر استریل رقیق‌سازی شدند. این ۶ رقت شامل: غلظت‌های ۲۵۶، ۱۲۸، ۶۴، ۳۲، ۱۶ و ۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. هر یک از این رقت‌ها به ۲۵ میلی‌لیتر محیط مولر هینتون آگار مذاب در دمای ۵۴ درجه سانتیگراد اضافه و در پلیت‌های ۸ سانتی‌متری ریخته شدند.

واجد ESBL باید گفت هیچ‌یک از عصاره‌ها تأثیر قابل‌قبولی روی سویه واجد ESBL نشان ندادند (جدول شماره ۱، ۲، ۳).

جدول شماره ۱: نتایج مشاهده‌شده از تأثیر عصاره بومادران بر سویه‌ها

نوع سویه	رقت ۸	رقت ۱۶	رقت ۳۲	رقت ۶۴	رقت ۱۲۸	رقت ۲۵۶
ایزوله محیطی	رشد باکتری	رشد باکتری	رشد باکتری	رشد باکتری	عدم رشد باکتری	عدم رشد باکتری
ایزوله واجد ESBL	رشد باکتری	رشد باکتری	رشد باکتری	رشد باکتری	رشد باکتری	رشد باکتری
ایزوله فاقد ESBL	رشد باکتری	رشد باکتری	رشد باکتری	رشد باکتری	رشد باکتری	رشد باکتری
ATCC27853	رشد باکتری	رشد باکتری	رشد باکتری	رشد باکتری	رشد باکتری	عدم رشد باکتری

جدول شماره ۲: نتایج مشاهده‌شده از تأثیر عصاره مورد بر سویه‌ها

نوع سویه	رقت ۸	رقت ۱۶	رقت ۳۲	رقت ۶۴	رقت ۱۲۸	رقت ۲۵۶
ایزوله محیطی	رشد باکتری	عدم رشد باکتری	عدم رشد باکتری	عدم رشد باکتری	عدم رشد باکتری	عدم رشد باکتری
ایزوله واجد ESBL	رشد باکتری	رشد باکتری	رشد باکتری	رشد باکتری	رشد باکتری	عدم رشد باکتری
ایزوله فاقد ESBL	رشد باکتری	رشد باکتری	رشد باکتری	عدم رشد باکتری	عدم رشد باکتری	عدم رشد باکتری
ATCC27853	رشد باکتری	رشد باکتری	رشد باکتری	عدم رشد باکتری	عدم رشد باکتری	عدم رشد باکتری

جدول شماره ۳: نتایج مشاهده‌شده از تأثیر عصاره سیر بر سویه‌ها

نوع سویه	رقت ۸	رقت ۱۶	رقت ۳۲	رقت ۶۴	رقت ۱۲۸	رقت ۲۵۶
ایزوله محیطی	عدم رشد باکتری	عدم رشد باکتری	عدم رشد باکتری	عدم رشد باکتری	عدم رشد باکتری	عدم رشد باکتری
ایزوله واجد ESBL	رشد باکتری	رشد باکتری	رشد باکتری	رشد باکتری	عدم رشد باکتری	عدم رشد باکتری
ایزوله فاقد ESBL	رشد باکتری	عدم رشد باکتری	عدم رشد باکتری	عدم رشد باکتری	عدم رشد باکتری	عدم رشد باکتری
ATCC27853	عدم رشد باکتری	عدم رشد باکتری	عدم رشد باکتری	عدم رشد باکتری	عدم رشد باکتری	عدم رشد باکتری

## بحث

بررسی‌ها حاکی از آن است که ارگانسیم‌های تولیدکننده ESBLs در سراسر جهان انتشار یافته‌اند و عفونت‌های ایجادشده به‌وسیله ایزوله‌های مقاوم، نگرانی‌های مهمی را به‌خصوص در کشورهای جهان سوم در پی داشته است که از پیامدهای ناشی از این امر می‌توان به افزایش مرگ‌ومیر، بالا رفتن مدت بستری در بیمارستان و افزایش در هزینه‌ها اشاره کرد (۱۶). در این میان، در حال حاضر سودوموناس آئروژینوزا یکی از چالش‌انگیزترین باکتری‌های پاتوژن در بیمارستان است که اهمیت ویژه‌ای در میان میکروبی‌شناسان پیدا کرده و دغدغه‌های مربوط به روند افزایش مقاومت این باکتری نیز بیش از پیش بارز شده است (۱۷). مطالعات گوناگون صورت گرفته بر روی مقاومت آنتی‌بیوتیکی این باکتری و به کارگیری انواع مختلفی از گیاهان، حتی فلزات مختلف در غالب فرم نانوذره مثل نانوذرات طلا یا نانوذرات نقره، نشان‌دهنده ضرورت مسئله و توجه ویژه جامعه میکروبی‌شناسی و داروسازی نسبت به یافتن راهکاری سودمند در جهت سرکوب

این روند مشکل‌آفرین است. از جمله این مطالعات می‌توان به بررسی صورت گرفته توسط خسروی و همکاران (سال ۱۳۸۴) اشاره کرد که در این تحقیق با بررسی تأثیر عصاره لاوندولا بر سودوموناس و چند باکتری دیگر، مقاومت بالای سودوموناس در برابر این عصاره مشاهده گردید (۱۸)، اما در مطالعه مشابهی که توسط رخشنده و همکاران انجام گرفت، گزارش‌ها حاکی از تأثیر قابل توجه عصاره آبی خرزهره بر روی این باکتری بود. تاج‌بخش و همکاران نیز در مطالعه خود تأثیر قابل توجه عصاره گیاه حرا را بر سودوموناس آئروژینوزا گزارش کردند (۱۹). در مطالعه دیگری که طاهری و همکاران انجام دادند گزارش جالبی مبنی بر اثر ضد میکروبی بالاتر چای سبز نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سفوتاکسیم، سفتازیدیم و آرتزثونام بر روی سودوموناس آئروژینوزا منتشر گردید (۲۰). در مطالعه مشابه دیگری، Janakat و همکاران تأثیر ضد میکروبی عصاره آبی نوعی قارچ صحرايي با نام علمی *Terfezia clavaryi* را بر روی سویه‌های مقاوم (MDR) سودوموناس آئروژینوزا بسیار مؤثر گزارش کردند (۲۱)

## نتیجه‌گیری

گزارش‌ها ثبت شده در باب این موضوع، باعث گردید تا در مطالعه حاضر تأثیر سه عصاره متانولی بومادران، مورد و سیر بر سویه‌های بیمارستانی مقاوم و حساس، همچنین محیطی سودوموناس آئروژینوزا مورد ارزیابی قرار گیرد. مشاهدات حاصل از این بررسی حاکی از مقاومت ایزوله‌های بیمارستانی نسبت به ایزوله‌های محیطی در برابر عصاره‌های یاد شده می‌باشد، همچنین سویه‌های دارای بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف نیز مقاومت بیشتری نسبت به سویه‌های حساس نشان دادند.

لازم به ذکر است عصاره سیر، بیشترین اثر را بر هر ۴ سویه برجای گذاشت که این امر می‌تواند روزنه امید برای ساخت آنتی‌بیوتیک طبیعی بر ضد سودوموناس‌ها و سایر باکتری‌های مقاوم باشد.

## تشکر و قدردانی

بدین وسیله صمیمانه از زحمات آقایان بیژن محمدی، فرشید فتح‌اللهی و وحید امام‌بخش (دانشجویان داروسازی دانشگاه علوم پزشکی کرمان) به خاطر کمک در تهیه عصاره‌های گیاهی، تقدیر و تشکر به عمل آوریم.

## References:

1. Gaspar MC, Couet W, Olivier JC, Pais AA, Sousa JJ. Pseudomonas aeruginosa infection in cystic fibrosis lung disease and new perspectives of treatment: A review. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2013;32(10):1231-52.
2. Hirsch EB, Tam VH. Impact of multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa bacteremia on patient outcomes. Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res 2010;10(4):441-51.
3. Friedland I, Gallagher G, King T, Woods GL. Antimicrobial susceptibility patterns in Pseudomonas aeruginosa: Data from a multicenter Intensive Care Unit Surveillance Study (ISS) in the United States. J Chemother 2004;16(5):437-41.
4. Richards MJ, Edwards JR, Culver DH, Gaynes RP. Nosocomial infections in medical intensive care units in the United States. National nosocomial infections surveillance system. Crit Care Med 1999;27(5):887-92.
5. Zavascki AP, Carvalhaes CG, Picão RC, Gales AC. Multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter baumannii: Resistance mechanisms and implications for therapy. Expert Rev Anti Infect Ther 2010;8(1):71-93.
6. Bouki C, Venieri D, Diamadopoulou E. Detection and fate of antibiotic resistant bacteria in wastewater treatment plants: A review. Ecotoxicol Environ Saf 2013;91:1-9.
7. Van Acker H, Van Dijck P, Coenye T. Molecular mechanisms of antimicrobial tolerance and resistance in bacterial and fungal biofilms. Trends Microbiol 2014;22(6):326-33.
8. Chand B. Antibacterial effect of garlic (allium sativum) and ginger (zingiber officinale) against staphylococcus aureus, salmonella typhi, escherichia coli and bacillus cereus. J Microbiol Biotechnol Food Sci 2013;2(4):2481-91.
9. Akin M, Aktumsek A, Nostro A. Antibacterial activity and composition of the essential oils of Eucalyptus camaldulensis Dehn. and Myrtus communis L. growing in Northern Cyprus. African J Biotechnol 2010;9(4):531-35.
10. Mahmoud Hosseini M, Harandizadeh F, Niazmand S, Soukhtanloo M, Faizpour A, Ghasemabady M. The role for nitric oxide on the effects of hydroalcoholic extract of Achillea wilhelmsii on seizure. Avicenna J Phytomed 2014;4(4):251-59.
11. Sharifi-Rad J, Hoseini-Alfatemi SM, Miri A, Sharifi-Rad M, Yazdanpanah E. Antifungal and antibacterial properties of Grapevine (Vitis vinifera L.) leaves methanolic extract from Iran-in vitro study. Am-Eur J Agric Environ Sci 2014;14(11):1312-16.
12. Goncagul G, Ayaz E. Antimicrobial effect of garlic (Allium sativum). Recent Pat Antiinfect Drug Discov 2010;5(1):91-3.

13. Glupczynski Y, Bogaerts P, Deplano A, Berhin C, Huang TD, Van Eldere J, et al. Detection and characterization of class A extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Belgian hospitals. *J Antimicrob Chemother* 2010;65(5):866-71.
14. Sharififar F, Moshafi MH, Mansouri SH, Khodashenas M. In vitro evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic *Zataria multiflora* Boiss. *Food Control* 2007;18(7):800-5.
15. Celiktas OY, Kocabas H, Bedir E, VardarSukan FV. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chem* 2007;10(2):553-59.
16. Potron A, Poirel L, Nordmann P. Nordmann, Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms and epidemiology. *Int J Antimicrob Agents* 2015;45(6):568-85.
17. Tam VH, Chang KT, Abdelraouf K, Brioso CG, Ameka M, McCaskey LA, et al. Prevalence, resistance mechanisms, and susceptibility of multidrug-resistant bloodstream isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54(3):1160-4.
18. Khosravi A, Malecan M. Effects of *lavandula stoechas* extracts on *staphylococcus aureus* and other gram negative bacteria. *J Qazvin Univ Med Sci* 2004;29: [Full Text in Persian]
19. Rakhshandeh H, Boroushaki MT, Parsaee H, Sadeghian A. Antimicrobial effect of different extracts of *Nerium oleander* L on standard and clinically isolated microorganism. *Koomesh* 2004;6(1):37-42. [Full Text in Persian]
20. Taherpour A, Hashemi A, Erfanimesh S, Taki E. Efficacy of methanolic extract of green and black teas against extended-spectrum beta-Lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Pak J Pharm Sci* 2016;29(4):1257-61.
21. Janakat SM, Al-Fakhiri SM, Sallal AK. Evaluation of antibacterial activity of aqueous and methanolic extracts of the truffle *Terfezia clavaryi* against *Pseudomonas aeruginosa*. *Saudi Med J* 2005;26(6):952-5.