

ISSN: 3041-9638

<https://jrpsm.asnrkh.ac.ir/>

Open Access

Research Article

Alteration of *exo* gene expression in clinical isolates of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* treated with plant metabolites (allicin and thymol)

S. Ataei Jaliseh¹  and H. Pourghafar¹¹Department of Biology, Ra.C., Islamic Azad University, Rasht, Iran.

Received: 02 Feb 2026

Accepted: 19 Jun 2026

Published: 19 Jun 2026

Corresponding Author:

Somayeh Ataei Jaliseh

Email:

sataei@iau.ac.ir

Keywords:

Real-Time PCR.

subMIC, *exoA*, *exoS*, *exoT*

Citation:

Ataei Jaliseh, S., Pourghafar, H. (2026). Alteration of *exo* gene expression in clinical isolates of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* treated with plant metabolites (allicin and thymol). *Journal of Research in Plant Metabolites*, 4(1), 85-96.

Doi:10.22034/jrpsm.2026.574356.1108

Extended Abstract

Background and Objective: *Pseudomonas aeruginosa* is a common cause of hospital-acquired infections due to its high pathogenicity potential. The spread of antibiotic resistance, especially in gram-negative bacteria, has led to the development of plant antibiotic compounds for the treatment of infections caused by these bacteria. In this study, the antimicrobial effects of the active ingredient allicin in garlic and thymol in a number of medicinal plants, including thyme, on the expression of *exoA*, *exoS*, and *exoT* genes of *P. aeruginosa* as important pathogenic factors were investigated.

Materials and Methods: Fifty clinical isolates from different patients were studied along with the Standard strain of *P. aeruginosa* ATCC27853. Various biochemical tests were performed to purify the bacteria, including the ability to produce hemolysin, oxidase, catalase, urease, growth ability at 42 °C, growth profile in Mac Conkey, TSI, SIM, and Mueller Hinton media, and Gram staining. Antibigram tests were performed on Mueller Hinton agar culture medium along with determination of *P. aeruginosa* sensitivity by disk diffusion method on antibiotics Cefepime, Gentamicin, Amikacin, Ceftazidime, Imipenem, and Ciprofloxacin (based on CLSI) and disks impregnated with the active ingredient allicin and thymol in the culture medium. After that, the zone of inhibition of bacterial growth was measured. Then MBC and MIC were performed, and DNA and RNA extraction, cDNA synthesis, and finally, Real-time PCR was performed to determine the effect of the active ingredients allicin and thymol on the expression of *exoA*, *exoS*, and *exoT* at subMIC concentrations.

Results: Out of 50 clinical isolates studied, 40 isolates of *P. aeruginosa* were identified and confirmed. The mean diameter of the inhibition zone of *P. aeruginosa* isolates at 10 mg.ml⁻¹ allicin and thymol were 19.2 and 17 mm, respectively. The highest resistance of bacteria to the antibiotics Ceftazidime and Imipenem, and the lowest to Amikacin and Gentamicin. The MIC was represented by a dilution of 1:8 and a concentration of 1.25 mg.ml⁻¹ allicin and thymol, and the MBC was represented by a dilution of 1:2 and a concentration of 2.5 mg.ml⁻¹ allicin and thymol. The presence of the studied *exo* genes in clinical isolates of *P. aeruginosa* was confirmed in the PCR product of the bacterial genome extracted with primers specific for each gene. The results obtained from real-time PCR showed that allicin at a subMIC concentration (0.6 mg.ml⁻¹) in this study reduced the expression of *exoA*, *exoS* and *exoT* genes in *P. aeruginosa* isolates. Data analysis showed that the expression of *exoT* and *exoS* genes in *P. aeruginosa* isolates treated with allicin was significantly reduced ($P<0.001$) and the *exoA* gene was significantly reduced ($P<0.01$). Also, the expression of *exoA* and *exoS* genes in *Pseudomonas* isolates treated with the active ingredient thymol at a subMIC concentration (0.6 mg.ml⁻¹) was significantly reduced ($P<0.001$).

Conclusion: This study showed that the active ingredient allicin in garlic and thymol in thyme, with a significant bactericidal effect, reduce the expression of *exo* genes in *P. aeruginosa*. It is hoped that the results obtained in the future, after conducting standard clinical research, will lead to the production of a drug containing the active ingredients allicin and thymol with a strong antibacterial effect.





دسترسی رایگان

مقاله پژوهشی

شماره شا‌پا: ۳۰۴۱-۹۶۳۸

تغییر بیان ژن‌های *exo* در جدایه‌های بالینی سودوموناس آنروژینوزای مقاوم به آنتی‌بیوتیک تحت تیمار با متابولیت‌های گیاهی (آلیسین و تیمول)

سمیه عطائی جلیسه^۱ و حورا پورغفار^۱

^۱ گروه زیست‌شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران.

تاریخ انتشار: ۱۴۰۵/۰۳/۲۹

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۳/۲۹

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۱۱/۱۸

چکیده سابقه و هدف: سودوموناس آنروژینوزا به دلیل پتانسیل بیماری‌زایی بالا، عامل شایع عفونت‌های بیمارستانی است. گسترش مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی به‌ویژه در باکتری‌های گرم منفی سبب شده است، به‌دست آوردن ترکیبات آنتی‌بیوتیکی گیاهی در درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری‌ها مورد توجه قرار گیرد. در این تحقیق اثرات ضد میکروبی ماده موثره آلیسین سیر و تیمول موجود در تعدادی از گیاهان دارویی از جمله آویشن بر روی بیان ژن‌های <i>exoS</i>، <i>exoA</i> و <i>exoT</i> سودوموناس آنروژینوزا به‌عنوان عوامل مهم بیماری‌زا مورد بررسی قرار گرفت. مواد و روش‌ها: تعداد ۵۰ جدایه بالینی باکتری از بیماران مختلف به‌همراه سویه استاندارد سودوموناس آنروژینوزا ATCC27853 مورد بررسی قرار گرفتند و برای خالص‌سازی باکتری تست‌های بیوشیمیایی مختلف شامل بررسی قابلیت تولید همولیزین، اکسیداز، کاتالاز، اوره‌آز، قابلیت رشد در دمای ۴۲ درجه سلسیوس، منظره رشد در محیط‌های مک‌کانکی، TSI و SIM و مولر هینتون انجام شد و با رنگ‌آمیزی گرم بررسی شدند و تست آنتی‌بیوگرام بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار همراه با تعیین حساسیت سودوموناس آنروژینوزا به‌روش دیسک دیفیوژن بر روی آنتی‌بیوتیک‌های سفپیم، جنتامایسین، آمیکاسین، سفتازیدیم، امی‌پنم و سیپروفلوکساسین (بر اساس جدول CLSI) و دیسک‌های آغشته به متابولیت آلیسین و تیمول در محیط کشت انجام شد و پس از آن هاله عدم رشد باکتری‌ها اندازه‌گیری گردید، در ادامه حداقل غلظت مهار و باکتری‌کشی (MIC و MBC)، ارزیابی و استخراج DNA، RNA، سنتز cDNA و در نهایت Real-time PCR جهت تعیین اثر دو ماده موثره گیاهی، آلیسین و تیمول، بر بیان ژن‌های <i>exoS</i>، <i>exoA</i> و <i>exoT</i> در غلظت زیر مهار (subMIC) انجام پذیرفت. یافته‌ها: از مجموع ۵۰ جدایه بالینی مورد بررسی، ۴۰ جدایه سودوموناس آنروژینوزا مورد شناسایی و تایید قرار گرفت. میانگین قطر هاله عدم رشد جدایه‌های بالینی سودوموناس آنروژینوزا در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آلیسین و تیمول، به‌ترتیب ۱۹/۲ و ۱۷ میلی‌متر به‌دست آمدند. بیش‌ترین مقاومت باکتری‌های سودوموناس در مقابل آنتی‌بیوتیک‌های سفتازیدیم و امی‌پنم و کم‌ترین مقاومت در مقابل آمیکاسین و جنتامایسین بود. رقت ۱:۸، غلظت ۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آلیسین و تیمول، نماینده MIC و رقت ۱:۲، غلظت ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آلیسین و تیمول، بیان‌گر MBC بود. حضور ژن‌های <i>exo</i> مورد بررسی در جدایه‌های بالینی سودوموناس آنروژینوزا در محصول PCR ژنوم باکتری استخراج شده با پرایمرهای اختصاصی هر ژن تایید شد. نتایج به‌دست آمده از Real-Time PCR نشان داد که آلیسین در غلظت زیرمهار (۰/۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) در این مطالعه باعث کاهش بیان ژن‌های <i>exoS</i>، <i>exoA</i> و <i>exoT</i> در جدایه‌های سودوموناس آنروژینوزا می‌شود. آنالیز داده‌ها نشان داد بیان ژن‌های <i>exoS</i> و <i>exoT</i> در جدایه‌های سودوموناس آنروژینوزا تحت تیمار با آلیسین، با $P < 0.001$ و ژن <i>exoA</i>، با $P < 0.01$، به‌طور معنی‌دار کاهش پیدا کرده است. هم‌چنین بیان ژن‌های <i>exoS</i> و <i>exoA</i> در جدایه‌های سودوموناس تحت تیمار با ماده موثره تیمول در غلظت subMIC (۰/۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به‌طور معنی‌دار ($P < 0.001$) کاهش پیدا کرد. نتیجه‌گیری: این تحقیق نشان داد متابولیت‌های گیاهی آلیسین در سیر و تیمول در آویشن، با اثر باکتری‌کشی قابل توجه، باعث کاهش بیان ژن‌های <i>exo</i> در سودوموناس آنروژینوزا می‌شوند. امید است نتایج به‌دست آمده از این تحقیق در آینده، بعد از انجام تحقیقات بالینی استاندارد، منجر به تولید دارویی حاوی ماده موثره آلیسین و تیمول با اثر ضدباکتریایی قوی شوند.	نویسنده مسئول: سمیه عطائی جلیسه ایمیل: sataei@iau.ac.ir واژه‌های کلیدی: Real-time PCR، subMIC، <i>exoT</i>، <i>exoS</i>، <i>exoA</i> نحوه استناد: عطائی جلیسه، س.، پور غفار، ح (۱۴۰۵). تغییر بیان ژن‌های <i>exo</i> در جدایه‌های بالینی سودوموناس آنروژینوزای مقاوم به آنتی‌بیوتیک تحت تیمار با متابولیت‌های گیاهی (آلیسین و تیمول). مجله پژوهش در متابولیت‌های گیاهی، دوره ۴، شماره ۱، صفحات: ۸۵-۹۶. Doi: 10.22034/jrpsm.2026.574356.1108
--	--

مقدمه

انسان در طول قرن‌ها، همواره از گیاهان به‌عنوان دارو استفاده کرده است. با توجه به مقاومت دارویی و عوارض جانبی داروهای ضدباکتری شیمیایی، رویکرد تحقیقات علمی به سمت منابع طبیعی دارویی در چند دهه اخیر بسیار معطوف شده است. بنابر گزارش سازمان بهداشت جهانی بیش از ۸۰ درصد مردم جهان (نزدیک به پنج میلیارد نفر) برای درمان بیماری‌ها هنوز از داروهای گیاهی استفاده می‌کنند. تقریباً یک چهارم داروهای تهیه شده در دنیا دارای منشأ گیاهی هستند که یا مستقیماً از گیاهان عصاره‌گیری و یا بر اساس ترکیب گیاهی، سنتز گردیده‌اند (Dehghan et al., 2009).

ارزش گیاهان دارویی بیشتر به دلیل تولید و عملکرد ترکیبات فعال ثانوی (متابولیت) است، که برخی از ترکیبات شامل: آلکالوئیدها، فلاونوئیدها، تانن‌ها، ساپونین‌ها، ترپنوئیدها و ترکیبات فنلی می‌باشند (Davies & Ryan, 2012). تیمول یا ۲-ایزوپروپیل-۵-متیل فنل، یک مشتق فنل مونوترپن طبیعی از Cymene که در مقادیر مختلف، در اسانس چندین گیاه متعلق به جنس آویشن، *Thymus* (Thyme)، پونه کوهی، *Origanum* (Origanum) و زیره، *Ajowan* Carum وجود دارد. کارواکرول و تیمول ترکیبات اصلی اسانس روغنی به دست آمده حاصل از آویشن و گیاهان مشابه می‌باشند که در آب نامحلول بوده، ولی در الکل و اتر حل می‌شوند. کارواکرول یک ترکیب فنلی مونوترپنیک است که ساختار آن به صورت $C_{10}H_{14}O$ -ایزوپروپیل-۲-متیل فنل و فرمول شیمیایی آن به صورت $C_{10}H_{14}O$ است. در واقع کارواکرول ایزومر تیمول بوده و بویی شبیه به تیمول دارد. هم‌چنین نتایج مطالعات برون تن (*invitro*) و درون تن (*invivo*) نشان می‌دهند که کارواکرول و تیمول دارای خواص مختلف زیستی و دارویی مانند آنتی‌اکسیدان، ضدباکتری، ضدقارچ، ضدسرطان، ضدالتهاب، محافظت از کبد، و شل‌کننده عضلات عروق می‌باشند. این محصولات هم‌چنین به‌عنوان آفت‌کش و ترکیب ضد میکروبی هم استفاده می‌شوند. اثر ضد میکروبی تیمول به دلیل نفوذ به غشاء سلول باکتری توسط این ماده است، که می‌تواند به کاتیون‌های سطح غشاء عوامل بیمارگر متصل شده و فعالیت‌های حیاتی آن‌ها را مختل کند (Omidbeigi, 1997).

سیر با نام علمی *Allium sativum* گیاهی است متعلق به خانواده لاله، که بومی آسیای میانه است. این گیاه از قرن‌ها قبل به‌عنوان ادویه و چاشنی غذا و نیز به‌عنوان دارو در طب گیاهی در درمان انواع مختلف بیماری‌ها استفاده می‌گردد. آلیسین یا دی‌آلیل‌دی‌سولفید اکسید مهم‌ترین ترکیب گوگردی سیر با فعالیت ضد میکروبی است. ترکیبات آن به دو گروه عمده ترکیبات سولفور و غیرسولفور تقسیم می‌شوند. خواص دارویی سیر عمدتاً به دلیل حضور ترکیب سولفور به نام آلیسین می‌باشد. آلیسین اولین بار

توسط چستر جی کاولیتو و جان‌های بایلی در سال ۱۹۴۴ از سیر استخراج و خالص‌سازی شد (Muhammad Wada et al., 2021). از ترکیبات سیر، آلتین، آلیسین، اسیدهای آلی، کربوهیدرات و ویتامین‌ها را می‌توان نام برد. به آلیسین روغن سیر هم گفته می‌شود که خواص ضد میکروبی سیر مربوط به همین ترکیب است. این ترکیب بخش عمده‌ای از خواص آنتی‌بیوتیکی خود را از طریق مهار اختصاصی آنزیم استیل کولین A سنتتاز ایفا می‌کند به طوری که، مهار این آنزیم موجب مهار تولید لیپید و اسیدهای چرب شده و در نهایت باعث اختلال در قابلیت زیستی میکروارگانیسم‌ها می‌شود (Davies & Ryan, 2012).

باکتری سودوموناس *آئروژینوزا*، باسیل گرم منفی، هوازی اجباری، غیرتخمیری متحرک با تک تازۀ قطبی با نیازهای غذایی حداقلی است (Aghaei et al., 2016). سودوموناس *آئروژینوزا*، یک بیمارگر فرصت طلب است که بیماران مبتلا به سیستمیک فیبروزیس، بیماران مبتلا به زخم‌های سوختگی و یا ترومای چشمی، افراد دچار ضعف یا نقص در سیستم ایمنی، هم‌چنین دریافت‌کنندگان پیوند عضو را به‌عنوان افراد مستعد به عفونت‌های مهلک ناشی از این ارگانیسم هدف قرار می‌دهد و لذا به‌عنوان یکی از عوامل بسیار مهم عفونت‌های بیمارستانی شمرده می‌شود. نیازهای تغذیه‌ای ساده، فاکتورهای ویروالانس متعدد و از همه مهم‌تر مقاومت به طیف وسیعی از مواد ضد میکروبی باعث شده که این ارگانیسم به یک بیمارگر خطرناک تبدیل شود. آنتی‌بیوتیک‌هایی که برای درمان عفونت‌های سودوموناسی به کار می‌روند شامل پنی‌سیلین‌های وسیع طیف (کاربنیسیلین، تیکارسیلین و پیراسیلین)، سفالوسپورین‌ها (سفتازیدیم و سفپیم)، کارباپنم‌ها (ایمی‌پنم و مروپنم)، آمینوگلیکوزیدها، فلوروکینولون‌ها و آزترونام هستند، در حالی که جدایه‌های سودوموناس *آئروژینوزا* که به این عوامل مقاومت نشان می‌دهند، در حال افزایش است (Zahedani et al., 2018).

عفونت‌های حاد ناشی از این باکتری به‌طور معمول در ارتباط با عوامل بیماری‌زا نظیر تاژک، پیلی، آگزوتوکسین و سیستم ترشحی تیپ سه (T3SS²) بوده است. در حالی که عفونت‌های مزمن ایجاد شده توسط سودوموناس *آئروژینوزا* به‌طور عمده در ارتباط با تشکیل بیوفیلم توسط این باکتری‌ها می‌باشد، به طوری که توانایی تشکیل بیوفیلم منجر به حفاظت باکتری در برابر تنش‌های محیطی از جمله خشکی، مواد کشنده و تنش‌های مکانیکی می‌شود. علاوه بر این، سیستم ترشحی تیپ سه، پروتئین‌های توکسینی که محصول ژن‌های *exoS*، *exoT*، *exoU*، *exoY* هستند را مستقیماً به سیتوپلاسم سلول‌های یوکاریوتی میزبان تزریق کرده و به این ترتیب

². Type Three Secretion System (T3SS)

۱:۳۲ تهیه گردید. سپس به‌همه لوله‌ها ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی (در حد نیم مک فارلند) اضافه شد. لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد. برای متابولیت تیمول همین کار تکرار گردید. هر لوله روی یک پلیت کشت خطی داده شد تا میزان رشد و عدم رشد باکتری مشاهده گردد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس قرارداده شدند و پس از گذشت ۲۴ ساعت نتایج MBC ثبت گردید.

بررسی تغییر بیان ژن

استخراج RNA: ۱۰۰ مقدار میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری با ۴۰۰ میکرولیتر Lysis solution ترکیب شد. به مدت ۲۰ ثانیه ورتکس و مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از محلول شستشو به میکروتیوب اضافه گردید. RNA استحصال شده با مقدار ۱ U/μl RNasin ترکیب و در دمای ۸۰- درجه سلسیوس تا زمان مصرف، نگهداری گردید. کیفیت و کمیت Total RNA (۰/۵۶۰ میکروگرم بر میکرولیتر) استخراج شده با نانودراپ و ژل الکتروفورز سنجش گردید.

مواد داخل کیت (سیناکلون، ایران) بعد از ذوب شدن به آرامی سانتریفیوژ شد. جهت آماده‌سازی RNA primer mixture مواد طبق دستور با هم ترکیب شد و سانتریفیوژ شد. این مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس حفظ گردید، سپس به مدت ۵۰ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سلسیوس قرار داده شد. در انتها میکروتیوب به مدت ۵ دقیقه در دمای ۸۵ درجه سلسیوس نگهداری، سپس سانتریفیوژ شد.

سنتز cDNA: جهت آماده‌سازی RNA primer mixture مواد طبق دستور کیت (سیناکلون، ایران) با هم ترکیب و سانتریفیوژ شد. این مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شد، در ادامه به مدت ۵۰ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سلسیوس حفظ شد. سپس میکروتیوب به مدت ۵ دقیقه در دمای ۸۵ درجه سلسیوس قرار داده شد. در خاتمه کار روی یخ منتقل گردید و سانتریفیوژ شد.

Real-time PCR: به منظور بررسی تاثیر ماده موثره آلیسین و تیمول بر بیان ژن‌ها Real-time PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر انجام شد که شامل، مستر سایبرگرین، پرایمرهای رپورس و فوروارد و cDNA است. جدول ۱ مشخصات پرایمرها و اندازه محصولات سنتز شده و جدول ۲ برنامه دستگاه ترموسایکلر در این مطالعه را نشان می‌دهد.

در بیماریزایی باکتری سهیم می‌شود. در این میان *exoS* و *exoT* به عنوان سم (توکسین)، عملکرد ADP-ریبوزیل ترانسفراز و GTP_{ase} شناخته می‌شوند. *exoY* و *exoU* نیز به ترتیب دارای فعالیت آدنیلات سیکلازی و فسفولیپازی هستند (Jabal Ameli et al., 2016). هدف از این تحقیق بررسی فعالیت ضد میکروبی دو متابولیت گیاهی تیمول و آلیسین و تاثیر آن‌ها بر بیان ژن‌های مولد آگروتوکسین، *exoA*، *exoS* و *exoT* در جدایه‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه: ۵۰ جدایه بالینی سودوموناس از آزمایشگاه بیمارستان پورسینای شهر رشت جمع‌آوری و جهت تایید گونه به همراه سویه استاندارد ATCC27853 مورد بررسی قرار گرفتند. خالص‌سازی باکتری تست‌های بیوشیمیایی مختلف شامل بررسی قابلیت تولید همولیزین، اکسیداز، کاتالاز، اوره‌آز، قابلیت رشد در دمای ۴۲ درجه سلسیوس، منظره رشد در محیط‌های مک‌کانکی، TSI و SIM و مولر هینتون انجام شد، سپس با رنگ‌آمیزی گرم مورد تایید و تشخیص قرار گرفتند (Forbes et al., 2002).

آنتی بیوگرام: برای انجام تست آنتی‌بیوگرام، محیط کشت مولر هینتون آگار تهیه و نمونه‌های سودوموناس آئروژینوزا بر اساس ۰/۵ مک فارلند به‌طور جداگانه در هر پلیت کشت پُر داده شدند. سپس شش آنتی‌بیوتیک سفپیم، جنتامایسین، آمیکاسین، سفتازیدیم، امی پنم و سیپروفلوکساسین (بر اساس جدول CLSI) و دیسک‌های آغشته به ماده موثره آلیسین و تیمول در روی پلیت حاوی محیط کشت قرار داده شد. پلیت‌ها در ادامه، به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد و پس از آن هاله عدم رشد باکتری‌ها با کولیس ورنیه اندازه‌گیری گردید.

ارزیابی حداقل غلظت مهاري و باکتری‌کشی (MIC و MBC) متابولیت‌های گیاهی: دو سری پنج‌تایی لوله آزمایش (تیمول و آلیسین) انتخاب و به ترتیب شماره‌گذاری شدند. در تمام لوله‌ها یک میلی‌لیتر محیط کشت مولر هینتون برات در کنار شعله روشن ریخته شد. سپس در اولین لوله ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر متابولیت (آلیسین یا تیمول) ریخته و کاملاً مخلوط شد. سپس به کمک سمپلر استریل یک میلی‌لیتر از لوله اول برداشته و در لوله دوم ریخته شد و پس از مخلوط نمودن مجدداً نیمی از آن به لوله بعدی انتقال داده شد و به همین صورت تا لوله پنجم ادامه داده و از لوله پنجم، یک میلی‌لیتر برداشته و دور ریخته شد. با این کار رقت ۱:۲ تا

جدول ۱- توالی پرایمر ژن های مورد بررسی واکنش PCR

Tab. 1- Primer sequences of genes examined in the PCR reaction

اندازه محصول (جفت باز) Product size (bp)	توالی پرایمر (5'→3') Primer sequence (5'→3')	ژن Gene
352	F=GGTAACCAGCTCAGCCACAT R=TGATGTCCAGGTCATGCTTC	<i>exoA</i>
459	F=AATCGCCGTCCAACATGCATGCG R=TGTTCGCCGAGGTACTGCTC	<i>exoT</i>
118	F=GCGAGGTCAGCAGAGTATCG R= TTCGGCGTCACTGTGGATGC	<i>exoS</i>

جدول ۲- برنامه دستگاه ترموسایکلر جهت انجام Real-time-PCR

Tab. 2 - Thermocycler program for performing Real-time-PCR

مرحله نهایی: منحنی ذوب Final stage: Melting curve	اتصال و طولی سازی Extension Annealing &	تعداد چرخه Cycle number	دنا تورا سیون اولیه Initial denaturation	ژن Gene
95°C 15 s	60°C 40 s	40 cycle 95°C 30 s	95°C 10 min	<i>exoA</i> , <i>exoS</i>
72°C 30 s	58°C 1 min	40 cycle 95°C 30 s	95°C 10 min	<i>exoT</i>
72°C 30 s	52°C 8 min	40 cycle 95°C 15 s	95°C 10 min	<i>16s rRNA</i>

نتایج و بحث

جدایه های سودوموناس آئروژینوزا در غلظت ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر آلیسین و تیمول، به ترتیب، ۱۹/۲ و ۱۷ میلی متر به دست آمد. جدول شماره ۳ و ۴ وضعیت ۴۰ جدایه بالینی سودوموناس آئروژینوزا نسبت به آنتی بیوتیک های مورد بررسی بر حسب جدول استاندارد CLSI را نشان می دهد.

از مجموع ۵۰ جدایه بالینی مورد بررسی، ۴۰ جدایه سودوموناس آئروژینوزا مورد شناسایی و تایید قرار گرفت. جهت سنجش مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه ها، شش دیسک آنتی بیوتیک براساس جدول CLSI انتخاب گردیدند. میانگین قطر هاله عدم رشد

جدول ۳- جدول استاندارد جهانی CLSI باکتری سودوموناس آئروژینوزا

Tab. 3 - CLSI global standard table for *P. aeruginosa* bacteria

مقاوم Resistant (mm)	حدواسط Interstitial (mm)	حساس (mm) Sensitive	آنتی بیوتیک Antibiotic
14	15-16	17	آمیکاسین Amikacin
14	15-17	18	سفپیم Cefepime
14	15-17	18	سفتازیدیم Ceftazidime
18	19-24	25	سیپروفلوکساسین Ciprofloxacin
12	13-14	15	جنتامایسین Gentamycin
15	16-18	19	امی پنم Imipenem

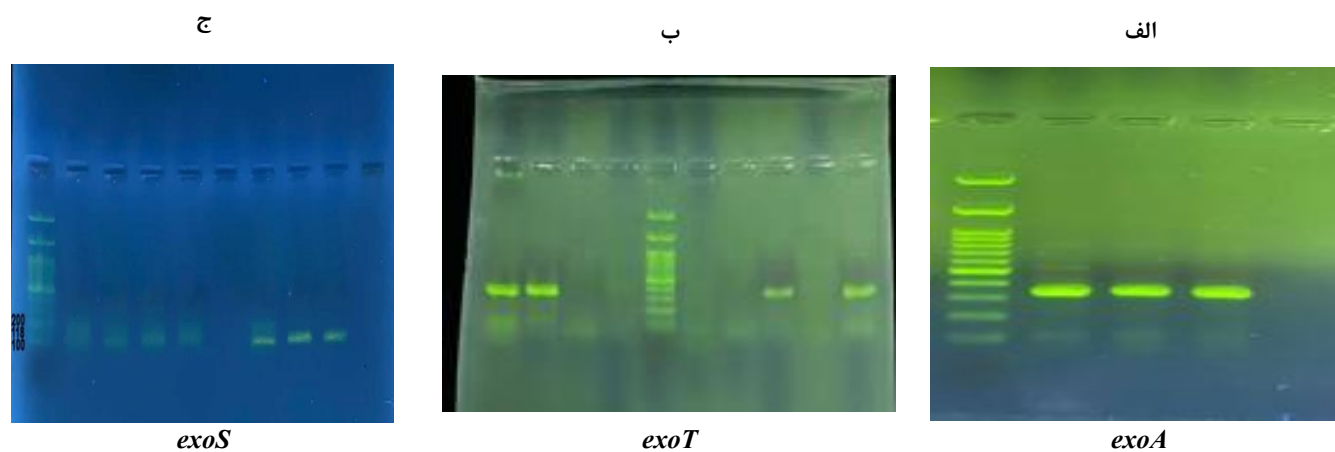
جدول ۴- وضعیت جدایه‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا (۴۰ جدایه) نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی طبق جدول CLSI

Tab. 4- Status of clinical isolates of *P. aeruginosa* (40 isolates) in relation to the antibiotics studied according to the CLSI table

آنتی بیوتیک Antibiotic	تعداد حساس Sensitive number	تعداد حدواسط Interstitial number	تعداد مقاوم Resistant number
آمیکاسین Amikacin	35	1	4
سقفیم Cefepime	9	1	30
سفتازیدیم Ceftazidime	8	2	30
سیپروفلوکساسین Ciprofloxacin	1	14	25
جنتامایسین Gentamycin	31	2	7
امی‌پنم Imipenem	5	5	30

حضور ژن‌های *exo* مورد بررسی در جدایه‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا در محصول PCR ژنوم باکتری استخراج شده با پرایمرهای اختصاصی هر ژن تایید شدند (شکل ۱). در ادامه تغییرات بیان ژن‌های *exo* مورد بررسی با واکنش Real-Time PCR مورد آنالیز قرار گرفتند.

نتایج حاصل از تست‌های تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) نشان داد، رقت ۱:۴، غلظت ۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر آلیسین و تیمول نماینده MBC و رقت ۱:۸، غلظت ۱/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر متابولیت‌های مذکور، نماینده MIC بود.



شکل ۱- ژل الکتروفورز محصولات PCR

الف) ژل الکتروفورز مربوط به ژن *exoA* با اندازه 352 جفت باز. ب) ژل الکتروفورز مربوط به ژن *exoT* با اندازه 459 جفت باز. ج) ژل الکتروفورز مربوط به ژن *exoS* با اندازه 118 جفت باز. چاهک‌های ژل به ترتیب شماره گذاری شده و شامل موارد زیر می‌باشند:

شکل الف: چاهک ۱، مارکر ۱۰۰ جفت باز (اسمو بایو، DM2100)، ۲، نمونه کنترل مثبت و چاهک ۳ و ۴، نمونه‌های بالینی *Pseudomonas aeruginosa* واجد ژن *exoA*

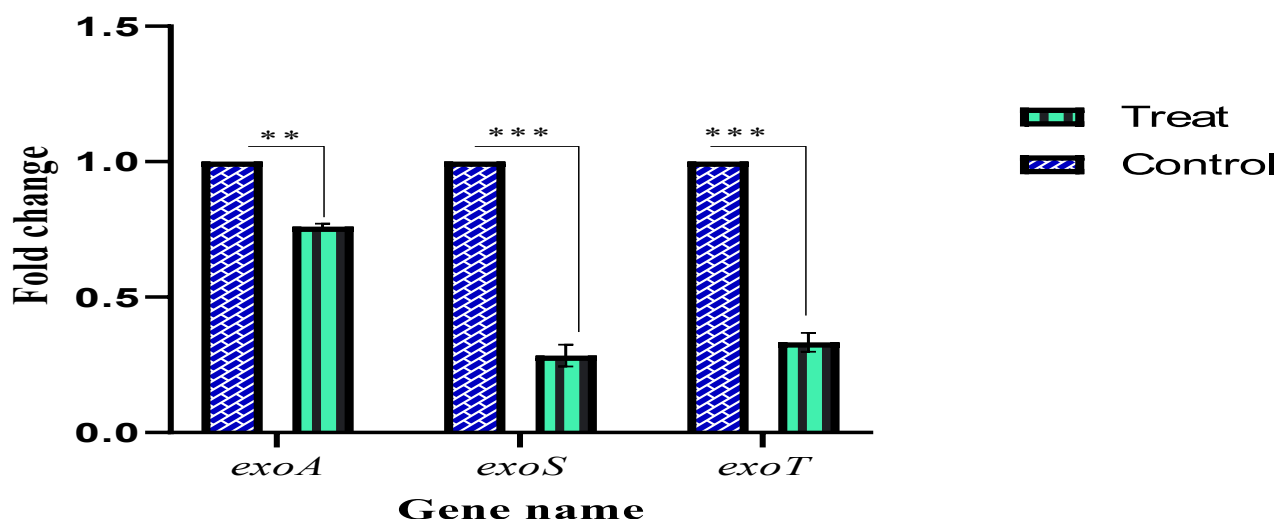
Fig. 1- Gel electrophoresis of PCR products

A: Electrophoresis gel for the *exoA* gene with a size of 352 bp. B: Electrophoresis gel for the *exoT* gene with a size of bp. C: Electrophoresis gel for the *exoS* gene with a size of 118 bp. The gel wells are numbered sequentially and include the following:

Fig. A: 1, DNA ladder 100 bp (Osmo Bio, DM2100), 2, positive control sample and 3 and 4, clinical samples of *Pseudomonas aeruginosa* carrying the *exoA* gene

آنالیز داده‌ها نشان داد بیان ژن‌های *exoS* و *exoT* در جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا تحت تیمار با آلیسین، با $P < 0.001$ و ژن *exoA* با $P < 0.01$ ، به‌طور معنی‌دار کاهش پیدا کرده است (شکل ۲).

نتایج به‌دست آمده از Real-Time PCR نشان داد که متابولیت آلیسین در غلظت subMIC ($0.6 \times$ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) در این مطالعه باعث کاهش بیان ژن‌های *exoA*، *exoS* و *exoT* در جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا می‌شود.



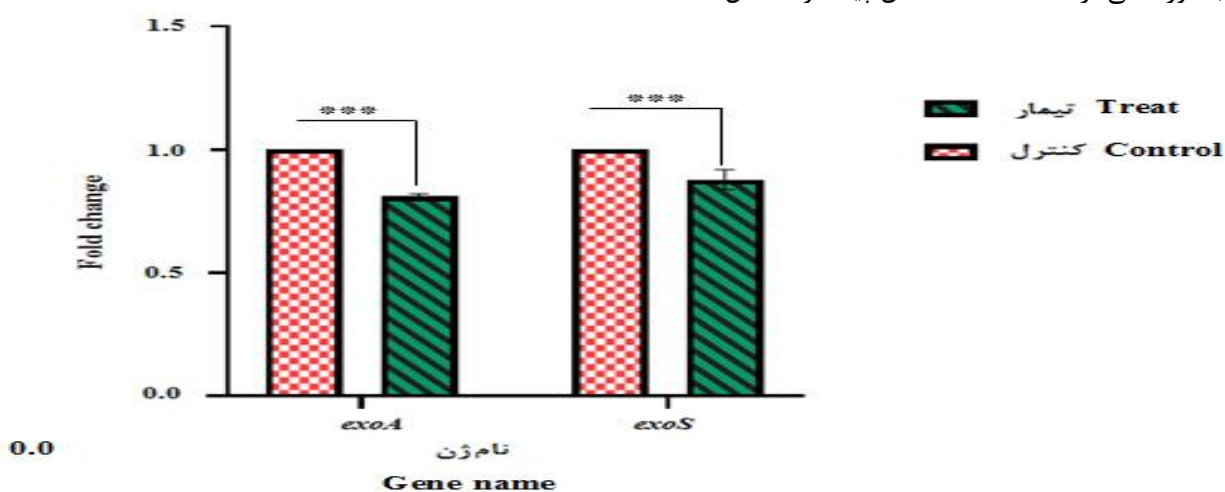
شکل ۲- میزان بیان ژن‌های *exoA*، *exoT* و *exoS* در جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزای تحت تیمار با آلیسین در مقایسه با کنترل (بدون تیمار)

*** نشان‌دهنده ($P < 0.001$) و ** نشان‌دهنده ($P < 0.01$) بین گروه تیمار و کنترل می‌باشد

Fig. 2- Expression levels of *exoA*, *exoT* and *exoS* genes in *P. aeruginosa* isolates treated with allicin compared to the control (without treatment)

*** indicates ($P < 0.001$) and ** indicates ($P < 0.01$) between the treatment and control groups

هم‌چنین بیان ژن‌های *exoA* و *exoS* در جدایه‌های سودوموناس تحت تیمار با متابولیت گیاهی تیمول در غلظت subMIC ($0.6 \times$ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به‌طور معنی‌دار ($P < 0.001$)، کاهش پیدا کرد (شکل ۳).



شکل ۳- میزان بیان ژن‌های *exoA* و *exoS* در سودوموناس آئروژینوزای تیمار شده با تیمول و کنترل (بدون تیمار).

***، نشان‌دهنده ($P < 0.001$) بین گروه تیمار و کنترل می‌باشد

Fig. 5- Expression levels of *exoA* and *exoS* genes in *P. aeruginosa* treated with thymol and control (without treatment).

*** indicates ($P < 0.001$) between the treatment and control groups

پژوهش تاثیر ضدباکتریایی اسانس سیر و رزماری بر برخی از باکتری های بیماریزای اصلی ورم پستان در گاو شیری به‌انجام رسید، نتایج نشان داد تمام غلظت‌های این اسانس‌ها (۱۰، ۳۰ و ۵۰ درصد) دارای اثر ضد میکروبی بودند و تاثیر اسانس‌ها با کم شدن غلظت آن‌ها در دیسک کم شد. هم‌چنین مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد بین آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی (پنی‌سیلین، باسیتراسین و استرپتومایسین) و اسانس‌ها در غلظت ۱۰ درصد نشان داد که، بین آنتی‌بیوتیک‌ها و اسانس‌ها تفاوت معنی‌دار وجود دارد. اسانس‌های سیر و رزماری با توجه به دارا بودن اثرات ضدباکتریایی بر علیه باکتری‌های اصلی مولد ورم پستان می‌توانند، گزینه‌های مناسبی به‌منظور جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها، در درمان ورم پستان در گاو باشند (Khodai Motlagh et al., 2021). در مطالعه جداگانه‌ای مشخص شد که عصاره سیر بر باکتری سودوموناس آئروژینوزا مؤثر بوده و این باکتری را نابود می‌کند (Fitriana et al., 2019). در مطالعه‌ای مشخص شد عصاره گیاهی سیر دارای اثر ضد میکروبی بالایی علیه *E. coli* با قطر هاله مهار ۳۵-۱۷ میلی‌متر و /استافیلوکوکوس /ورئوس با قطر هاله مهار ۳۰-۱۶ میلی‌متر است (Okoye & Famefuna, 2010). اثر سیر بر ممانعت از رشد باکتری سودوموناس آئروژینوزا توسط مولانا و همکاران به‌انجام رسید. نتایج این تحقیق نشان داد عصاره کلروفرمی گیاه سیر در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، هاله عدم رشدی معادل دیسک ۱۰ میکروگرمی آنتی‌بیوتیک جنتامایسین ایجاد می‌کند. هم‌چنین نتایج تحقیق نشان داد سیر منجمد در مقایسه با سیر حرارت دیده، خواص باکتری‌کشی بیش‌تری دارد (Molana & Shahandeh, 2003).

در مطالعه‌ای MIC و MBC آلیسین بر روی سودوموناس آئروژینوزا به ترتیب ۲/۳۸ و ۴/۷۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود که بر روی عامل عفونت پوستی از نوع باکتری سودوموناس آئروژینوزا مؤثر بوده است (Mirzaei et al., 2014). در پژوهشی دیگر عصاره آبی و الکلی سیر تاثیر بهتری بر کاهش میزان بیان ژنهای اگزوتوکسین و مهار تولید فاکتورهای بیماری‌زا در در غلظت ۸ میلی‌گرم بر سودوموناس آئروژینوزا داشتند (Kaviani et al., 2014). سویه‌های سودوموناس آئروژینوزای مقاوم به بتالاکتام تحت تیمار آلیسین کاهش بیان ژن مقاومت به بتالاکتام را نسبت به سویه تیمار نشده نشان می‌دهد و نتیجه این که تیمار با آلیسین منجر به کاهش مقاومت به بتالاکتام می‌گردد (Ataei & Pourghaffar, 2025). نتایج تحقیق ما هم همسو با تحقیقات فوق، اثر ضدباکتریایی مطلوب آلیسین به‌عنوان متابولیت اصلی گیاه سیر در محیط برون تن را گزارش می‌نماید. مقایسه تاثیر عصاره گیاهی آویشن، میخک و دارچین با نیستاتین بر میزان مهار کاندیدا آلبیکانس مورد بررسی قرار گرفت. میزان هاله عدم رشد

با توجه به افزایش مقاومت باکتری‌ها به انواعی از آنتی‌بیوتیک‌ها تلاش برای دست‌یابی به آگاهی‌های بیش‌تر از موارد استفاده مؤثر ترکیبات موجود در گیاهان و کاربردشان در درمان بیماری‌های مختلف صورت گرفته است. مقاومت آنتی‌بیوتیکی در همه کشورهای جهان یکی از معضلات مهم در درمان بیماری‌های عفونی می‌باشد. سیر دارای ترکیبات آلی گوگرددار است، که بسیار واکنش‌پذیرند و خاصیت ضد میکروبی وسیع بر روی باکتری‌ها حتی در غلظت‌های بسیار پایین دارند. آلیسین یک ترکیب روغنی و با رنگ زرد روشن می‌باشد، که عطر خاص سیر را به‌وجود می‌آورد. به آلیسین روغن سیر هم گفته می‌شود، که خواص ضد میکروبی سیر مربوط به همین ترکیب است. این ترکیب بخش عمده‌ای از خواص آنتی‌بیوتیکی خود را از طریق مهار اختصاصی آنزیم استیل کولین A سنتتاز، ایفا می‌کند؛ به‌طوری‌که مهار این آنزیم، موجب مهار تولید لیپید و اسیدهای چرب شده و در نهایت باعث اختلال در قابلیت زیستی میکروارگانیسم‌ها می‌شود. یکی از خصوصیات مهم آلیسین قابلیت نفوذپذیری و عبور از فسفولیپیدهای غشا است، که به‌همین دلیل می‌تواند آزادانه از غشا عبور کرده و وظایف خود را انجام دهد. کارواکرول و تیمول ترکیبات اصلی اسانس روغنی به‌دست آمده حاصل از آویشن و گیاهان مشابه می‌باشند که در آب نامحلول بوده ولی در الکل و اتر حل می‌شوند. کارواکرول یک ترکیب فنلی مونوترپنیک است که ساختار آن به‌صورت ۵-ایزوپروپیل -۲- متیل فنل و فرمول شیمیایی آن به‌صورت $C_{10}H_{14}O$ می‌باشد. فرمول شیمیایی تیمول نیز مشابه کارواکرول است، تفاوت آن با کارواکرول در جایگاه گروه هیدروکسیل در ساختار آن است. در واقع کارواکرول ایزومر تیمول بوده و بویی شبیه به تیمول دارد (Arbabi et al., 2018). نتایج مطالعات برون تن و درون تن نشان می‌دهد که کارواکرول و تیمول دارای خواص مختلف زیستی و دارویی مانند آنتی‌اکسیدان، ضدباکتری، ضدقارچ، ضدسرطان، ضدالتهاب، محافظت از کبد، شل‌کننده عضلات و عروق می‌باشند. اثر ضد میکروبی تیمول ناشی از نفوذ به غشاء سلول باکتری می‌باشد، بعد از نفوذ، به کاتیون‌های سطح غشاء عوامل بیمارگر متصل شده و فعالیت‌های حیاتی آن‌ها را مختل کند. از طریق واکنش با غشاء میکروارگانیسم‌ها و تغییر در نفوذپذیری ترکیباتی چون پتاسیم و هیدروژن دارای اثرات ضد میکروبی است. اثر مهار عصاره سیر، پیاز و موسیر به‌روش انتشار دیسک بر روی تعدادی از باکتری‌ها و مخمرها از جمله، سودوموناس آئروژینوزا و /استافیلوکوکوس /ورئوس بررسی شد. مطابق این بررسی همه ارگانیسم‌ها به‌وسیله عصاره سیر مهار شدند، غلظت بالایی از عصاره سیر، دارای اثر باکتری‌کشی بر روی سودوموناس آئروژینوزا بود (Fitriana et al., 2019). در یک

سلول مهار و باعث صدمات به بافت ریه و مغز شود. این سم نیز دارای فعالیت ADP ریبوزیل ترانسفرازی بوده و موجب القای تولید اینترلوکین ۱ می‌شود. پتانسیل قوی سودوموناس *آئروژینوزا* برای حمل ژن‌های الحاقی غیر کروموزومی (روی پلاسمیدها و ترانسپوزون‌ها) می‌تواند دلیل خوبی برای وجود و گسترش مقاومت آنتی‌بیوتیکی، به‌خصوص هنگام مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها باشد و حضور مقاومت به‌همراه عوامل بیماری‌زایی نیز می‌تواند این باکتری را به‌عنوان یک بیمارگر بالقوه معرفی نماید (Aghaei et al., 2016). نتایج به‌دست آمده از مطالعه ما به‌وسیله Real-Time PCR نشان داد که، آلپسین و تیمول منجر به کاهش بیان ژن‌های *exoA*، *exoS* و *exoT* می‌شوند. (Jlee et al., 2003) بر روی مشارکت عوامل تنظیم‌شده *exoA* در عفونت قرنیه توسط سودوموناس *آئروژینوزا* بیمارگر و مهاجم مطالعه نمودند. برای سویه بیمارگر جهش *exoU* یا *exoT* به‌تنهایی تاثیر کمی بر حدت داشت، درحالی‌که جهش هم‌زمان *exoU* و *exoT* یا *exoA* منجر به کاهش قابل توجهی در ایجاد بیماری قرنیه می‌شود. *exoA* با همراهی *exoU* و *exoT* به بقای باکتری و شدت بیماری‌زایی قرنیه فقط سودوموناس *آئروژینوزا* بیمارگر کمک می‌کند. (Shen et al., 2009) در مورد چارپون‌های *orf1/gv* در *exoS* برای ترشح نوع سه توسط سودوموناس *آئروژینوزا* مطالعه نمودند، آزمون کششی نشان داد که، *orf1* به *exoS* و *exoT* متصل می‌شود. تجزیه و تحلیل مشخصات ترشح نشان داد که *orf1* برای ترشح مطلوب *exoS* و *exoT* ضروری است (Augustin et al., 2007). آلپسین با گروه‌های تیول واکنش می‌دهد و می‌تواند آنزیم‌های ضروری را غیرفعال کند. با این حال، آلپسین در دمای اتاق ناپایدار است و فعالیت ضد میکروبی در عرض چند دقیقه پس از حرارت دادن تا ۸۰ درجه سلسیوس، بیش‌تر از بین می‌رود. فعالیت ضد میکروبی آلپسین به‌دلیل گروه تیوسولفینات است، ترکیبات فرارتر خواص ضد میکروبی قابل توجهی را از طریق فاز گاز نشان دادند. تیوسولفینات‌ها از نظر اثربخشی بر روی ارگانیسم‌های خاص متفاوت بودند و برخی از نظر حرارتی پایدارتر از آلپسین بودند. این آنالوگ‌ها می‌توانند برای کاربرد در پزشکی و کشاورزی به‌صورت جداگانه، یا در ترکیب با سایر ترکیبات ضد میکروبی مناسب باشند.

نتیجه گیری

نتایج به‌دست آمده از این بررسی نشان داد که ماده موثره آلپسین در سیر، سبب کاهش بیان ژن *exoA*، *exoS* و *exoT* در باکتری سودوموناس *آئروژینوزا* می‌شود و ماده موثره تیمول نیز در آویشن سبب کاهش بیان ژن *exoA* و *exoS* در این باکتری است. داروهای گیاهی عوارض جانبی کم‌تری نسبت به داروهای شیمیایی دارند و

میخک (۲۷/۴۰ میلی‌متر) و آویشن (۱۳/۰۰ میلی‌متر) با تفاوت معنی‌داری از نیستاتین (۳۲/۶۰ میلی‌متر) کم‌تر بود. آویشن، میخک و دارچین تأثیرات ضدقارچی روی *کاندیدا آلبیکانس* را نشان دادند (Arbabi et al., 2018). در پژوهشی به بررسی اثر ضد میکروبی و سمیت ترکیب‌های طبیعی تشکیل‌دهنده روغن‌های ضروری پرداختند و مکانیسم اثر این اجزاء را در فعالیت‌شان علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* و *شرشیا کلی* بررسی نمودند. نتایج نشان داد کارواکرول و تیمول به‌عنوان دو ترکیب اصلی گیاه آویشن دارای اثرات ضد میکروبی علیه تعداد زیادی از میکروارگانیسم‌ها می‌باشند (Garcia-Salinas et al., 2018). تست‌های تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) مطالعه ما نشان داد که، رقت ۱:۴، غلظت ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آلپسین، غلظت ۱/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تیمول، نماینده MIC، و رقت ۱:۲، غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آلپسین و غلظت ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تیمول، نماینده MBC است. در مطالعه دیگری حداقل غلظت مهارتی برای باکتری *E. coli* (۳۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و برای *S. aureus* (۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) گزارش شد (Okoye & Famefun, 2010). در بررسی که توسط Cutler و Wilson در سال ۲۰۲۰ انجام شد، نتایج نشان داد که عصاره سیر در غلظت ۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، MBC و در غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، MIC را علیه باکتری نشان داد. در مطالعه حاضر، قطر هاله عدم رشد در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، آلپسین با میانگین ۱۹/۲ میلی‌متر و تیمول با میانگین ۱۷ میلی‌متر به‌دست آمد این نتایج، مشابه مطالعه ما اثرات ضد میکروبی مطلوب آلپسین و تیمول را گزارش می‌نمایند. سودوموناس *آئروژینوزا* باسیلی گرم منفی، هوازی اجباری، متحرک و فاقد اسپور بوده که به‌صورت ساپروفیت در محیط وجود دارد (Mokhtari & Amini, 2012). یکی از عوامل مهم این باکتری، سیستم ترشحاتی نوع سوم است که عامل تزریق مستقیم یک سری از پروتئین‌ها به درون سیتوزول سلول هدف می‌باشد. پنج آنزیم مهم شامل، اگزوانزیم A، T، S، U و T وجود دارند. اگزوانزیم S و T، اولین اگزوانزیم‌های شناخته شده در این گروه هستند. اگزوانزیم S نیز یک سم سلول (سیتوتوکسین) است که در کلونیزه شدن باکتری نقش ایفا می‌کند. اگزوانزیم T در هنگام انتشار و فرار بیمارگر تولید می‌شود. در ضمن هر دوی این اگزوانزیم‌ها فعالیت ADP-ریبوزیل ترانسفرازی دارند که از نظر آسیب‌شناسی مشابه سم (توکسین) کلرا عمل می‌کنند. اگزوانزیم‌های T و S، فعالیت ADP-ریبوزیل ترانسفرازی دارند و باعث کاهش فعالیت ماکروفاژها و فاگوسیتوزها می‌شوند. اگزوتوکسین مهم دیگر این باکتری، اگزوتوکسین A می‌باشد (Althunibat et al., 2011). این سم برای سلول‌های یوکاریوتیک سمی بوده و می‌تواند پروتئین‌سازی را درون

تولید دارویی حاوی متابولیت گیاهی آلیسین و تیمول، با اثر ضدباکتریایی مطلوب در آینده شود.

این مطلب امید موفقیت در استفاده از آن‌ها را در آینده دو چندان می‌نماید. امید است، نتایج به‌دست آمده از این تحقیق، منجر به

منابع

- Aghaei, S., Javadi, A., Sharifi, Y. & Marvati A. (2016). Detection of exotoxin genes A, Y, T, U, S in *Pseudomonas aeruginosa* resistant to third-generation cephalosporins isolated from clinical samples of patients hospitalized in Qom hospitals, *Qom University of Medical Sciences Journal*, 1(10): 48-49 (In persian). [https://doi: 20.1001.1.17357799.1395.10.1.9.9](https://doi.org/10.1001.1.17357799.1395.10.1.9.9).
- Althunibat, O., Qaralleh, H., Sati, Y., Muayad, A., Khleifat, K.H., Ibrahim, S., Majali, H. & Aldalin Walid, A. (2011). Effect of Thymol and Carvacrol, the Major Components of *Thymus capitates* on the Growth of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of pure and applied microbiology*, 10(6): 367-374. [https://doi: 10.22207/JPAM.10.1.49](https://doi.org/10.22207/JPAM.10.1.49).
- Arbabi klati, F., shirazi, M., pourzamani, M. & Dabiri, S. (2018). Comparing the effect of herbal extracts of thyme, cloves, and cinnamon with nystatin on the inhibition of *Candida albicans*. *Journal of Research in Dental Sciences*, 8(4):175-179 (In persian). [https://doi: 20.1001.1.20084676.1390.8.4.3.8](https://doi.org/10.1001.1.20084676.1390.8.4.3.8).
- Ataei, S. & Pourghaffar H. (2025). Investigation of the effect of the active ingredient allicin and cinnamon on beta-lactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa* under invitro conditions and bioinformatics study. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plant Research*, 42(1):584-590(In Persian). [https://doi: 10.22092/ijmapr.2026.368772.3524](https://doi.org/10.22092/ijmapr.2026.368772.3524).
- Augustin, D., Song, Y., Beak, M., Sawa, Y. & Singh, G. (2007). Presence or absence of lipopolysaccharide O antigens affects type III secretion by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 189(6): 204-213. [https://doi: 10.1128/JB.01839-06](https://doi.org/10.1128/JB.01839-06).
- Cutler, R. & Wilson, P. (2020). Antibacterial activity of a new, stable, aqueous extract of allicin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *British journal of Biomedical science*, 61(2): 71-4. [https://doi: 10.1080/09674845.2004.11732646](https://doi.org/10.1080/09674845.2004.11732646).
- Davies, J. & Ryan, K.S. (2012). Introducing the parvome: Bioactive compounds in the microbial world. *ACS Chemical Biology*, 225-252. [https://doi: 10.1021/cb200337h](https://doi.org/10.1021/cb200337h).
- Dehghan, A., Ebadi, M., Naqdabadi, H., Shahriari, F., Azizi, M. & Asghari, G. (2009). A review of new techniques in the production of tropane alkaloids. *Journal of Medicinal Plants*, 9(1): 33 (In Persian). [https://doi: 20.1001.1.2717204.2010.9.33.18.4](https://doi.org/10.1001.1.2717204.2010.9.33.18.4).
- Fitriana, N., Aniya, A., Pamasayah, F., Anam, M. & Lestari, S. (2019). The effectiveness comparison of single bulb garlic extract for antibacterial agent *Pseudomonas aeruginosa*. *International Conference on Life Sciences and Technology*, 12-28. [https://doi: 10.1088/1755-1315/276/1/012028](https://doi.org/10.1088/1755-1315/276/1/012028).
- Forbes, B.A., Sahm, D.F. & Weissfeld, A.S. (2009). Diagnostic Microbiology. 11th ed. Missouri: Mosby Company, 389-391.
- García-Salinas. S., Elizondo-Castillo, H., Arruebo, M., Mendoza, G. & Irusta, S. (2018). Evaluation of the Antimicrobial Activity and Cytotoxicity of Different Components of Natural Origin Present in Essential Oils, *Molecules*. 23(1): 39-49. [https://doi: 10.3390/molecules23061399](https://doi.org/10.3390/molecules23061399).
- Jabal Ameli, L., Aini, M. & Jabal Ameli, F. (2017). Evaluation of antibiotic resistance patterns, detection of *exo* genes and determination of biofilm formation ability of *Pseudomonas aeruginosa* isolates obtained from blood and urine samples. *Journal of Molecular Cellular Biotechnology*, 28(7): 62-66 (In Persian). [https://doi: 20.1001.1.22285458.1396.7.28.7.1](https://doi.org/10.1001.1.22285458.1396.7.28.7.1).
- JLee, E., Acowell, B., JEvans, D. & Fleiszig, S. (2003). Contribution of *exsA*-regulated factors to corneal infection by cytotoxic and invasive *Pseudomonas aeruginosa* in a murine scarification model. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 44(9): 3892-3898. [https://doi: 10.1167/iov.02-1302](https://doi.org/10.1167/iov.02-1302).
- Khodai Motlagh, M., Rahimi, M., Khormian, B., Derlich, M. & Azizzadeh, M. (2021). Monitoring udder health status using somatic cell counts in Holstein dairy herds in northeastern Iran and the effectiveness of a 10-point mastitis control program. *Iranian Veterinary Journal*, 22(4): 326-330 (In Persian). [https://doi: 10.22099/IJVR.2021.40046.5805](https://doi.org/10.22099/IJVR.2021.40046.5805).
- Mokhtari, Kh. & Amini, K. (2020). Molecular identification of virulence genes in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from human and animal samples and their antibiotic resistance pattern. *Iranian journal of medical microbiology*, 13(7): 294-296. [https://doi: 10.30699/ijmm.13.4.294](https://doi.org/10.30699/ijmm.13.4.294).
- Molana, Z. & Shahandeh, Z. (2003). The effect of garlic and its extract on inhibiting the growth of *Pseudomonas aeruginosa*. *Scientific Journal of Babol Faculty of Medical Sciences*, 5(3): 57-62 (In persian). [https://doi: 20.1001.1.15614107.1382.5.3.10.7](https://doi.org/10.1001.1.15614107.1382.5.3.10.7).
- Muhammad Wada, N., Adamu Ambi, A., Aliyu Ibrahim, A., Kirfi Bello, S., Abdullahi U., Timothy James, D. (2021). Antimicrobial Activity of Extracts of Turmeric (*Curcuma longa*) and Garlic (*Allium sativum*) Against Selected Bacterial Clinical Isolates. *Mediterranean Journal of Infection Microbes and Antimicrobials*, 10(6): 1-7. [https://doi: 10.4274/mjima.galenos.2021.2020.6](https://doi.org/10.4274/mjima.galenos.2021.2020.6).
- Okoye, A. & Famefun, L. (2010). *Invitro* Determination of Bactericidal Effects of Garlic (*Allium sativum*) on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Nigerian Journal of Science, Technology and Environmental Education (NIJOSTEE)*, 3(1): 28-29. [https://doi: https://doi: 10.20546/ijcmas.2019.809.060](https://doi.org/10.20546/ijcmas.2019.809.060).
- Omidbeigi, R. (1997). Production and processing of medicinal plants. *Tehran: Tararan Pub*, 72 (In Persian).
- Shen-kang, Q., Bonnet, L., Kuhn, M., Derouazi, L. & Lamdtte, D. (2008). Orf1/ Spcs chaperones *exoS* for type three secretion by *Pseudomonas aeruginosa*. *Biomedical and*

- Enviromental Sciences*, 21(2): 103-109. [https://doi:10.1016/S0895-3988\(08\)60014-8](https://doi:10.1016/S0895-3988(08)60014-8).
- Zahedani, S., Jahantigham, M. & Amini, Y. (2018).** Determination of antibiotic resistance pattern in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of the Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences*, 8(76): 517-518 (In Persian). [https://doi: 10.29252/iau.28.3.212](https://doi:10.29252/iau.28.3.212).