Original Article

Evaluation of Antimicrobial and Anti-Quorum Sensing Activity of Mazouj and Ghalghaf Galls Extracts of Oak against Pseudomonas aeruginosa

Shideh Fatehi[1], Maryam Mohammadi Sichani[1*], Majid Tavakoli[2]

[1]*Department of Microbiology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.*

[2]*Agricultural & Natural Resources Research Center of Lorestan, Khorramabad, Iran.*

[*]***Corresponding Author:*** **Maryam Mohammadi Sichani;** Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

Email: mohamadi_m@iaufala.ac.ir

Received: 16 Jan, 2018
Accepted: 18 Aug, 2018

Abstract

Background and Objectives: Infections caused by resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains mostly originate from hospitals, and its prevalence is increasing in many countries of the world. Therefore, many efforts have been made to find new active plant compounds as an appropriate substitute for antibiotics. The purpose of this study was to evaluate the active compounds, antibacterial and antibiofilm activity of aqueous and methanol extracts of Mazuj and Ghalghaf galls against *Pseudomonas aeruginosa*.

Methods: This study was performed on standard strain of *Pseudomonas aeruginosa* and a number of clinical strains. The methanol and aqueous extract of Mazuj and Ghalghaf galls, were prepared by Soxhlet method. Antibacterial activity of the extracts was assessed by well diffusion method, minimum inhibitory concentration (MIC) by microdilution method. The anti-quorum sensing activity of methanol and aqueous extracts of Mazuj and Ghalghaf galls was investigated on anti-biofilm activity of *Pseudomonas aeruginosa*.

Results: The methanol and aqueous extracts of Mazuj and Ghalghaf galls showed antibacterial activity against *Pseudomonas aeruginosa*. The MIC values of the extracts were obtained to be 6.25-25mg/ml. The extracts of Mazuj and Ghalghaf galls inhibited the formation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in concentrations higher than 6.25.

Conclusion: According to the results of this study, the extracts of Mazuj gall have appropriate antibacterial activity against the studied bacteria. Also, the methanol extract had higher antibacterial activity than the aqueous extract. Therefore, it is suggested that more extensive research be conducted on the identification of its antimicrobial compounds as a suitable alternative to antibiotics for the treatment of diseases.

Keywords: Plant extract; Anti-infective agents; *Pseudomonas aeruginosa*; Mazuj gall; Ghalghaf gall; Active constituents; Antibacterial activity.

مجله دانشگاه علوم پزشکی قم
دوره دوازدهم، شماره دهم، دی ۹۷
صفحه ۳۶ الی ۴۵

مقاله پژوهشی
(Original Article)

ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی و آنتی‌کوئرم سنسینگ گال‌های مازوج و قلقاف درخت بلوط بر روی *سودوموناس آئروژینوزا*

شیده فاتحی[۱]، مریم محمدی سیچانی[۱*]، مجید توکلی[۲]

[۱]گروه میکروب‌شناسی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.

[۲]مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی لرستان، خرم‌آباد، ایران.

[*]نویسنده مسئول مکاتبات:
مریم محمدی سیچانی؛ واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.

آدرس پست الکترونیکی:
mohamadi_m@iaufala.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۰/۲۶
تاریخ پذیرش: ۹۷/۵/۲۷

چکیده

زمینه و هدف: عفونت‌های ایجادشده به‌وسیله سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزای* مقاوم، در بیشتر موارد منشأ بیمارستانی دارند که شیوع آن در بسیاری از کشورهای جهان در حال افزایش است؛ از این‌رو تلاش‌های بسیاری جهت یافتن ترکیبات فعال گیاهی جدید به‌عنوان جایگزینی مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌ها صورت گرفته است. این مطالعه با هدف بررسی ترکیبات فعال و فعالیت ضدباکتریایی و بیوفیلمی عصاره آبی و متانولی گال قلقاف و مازو بر روی *سودوموناس آئروژینوزا* انجام شد.

روش بررسی: این مطالعه تجربی بر روی سویه استاندارد *سودوموناس آئروژینوزا* و تعدادی سویه بالینی انجام گرفت. عصاره متانولی و آبی گال قلقاف و مازو به روش سوکسله تهیه شد. فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌ها به روش انتشار در چاهک، کمترین غلظت بازدارندگی (MIC) به روش میکرودایلوشن، همچنین اثر آنتی‌کوئرم سنسینگ عصاره آبی و متانولی گال قلقاف و مازو بر فعالیت ضدبیوفیلمی *سودوموناس آئروژینوزا* بررسی گردید.

یافته‌ها: عصاره‌های متانولی و آبی گال مازو و قلقاف، خاصیت ضدباکتریایی برعلیه *سودوموناس آئروژینوزا* از خود نشان دادند. حداقل غلظت مهارکننده عصاره‌ها بین ۲۵- ۶/۲۵ میلی‌گرم برمیلی‌متر به دست آمد. عصاره‌های گال مازو در غلظت‌های بالاتر از ۶/۲۵ میلی‌گرم برمیلی‌متر، مانع از تشکیل بیوفیلم *سودوموناس آئروژینوزا* گردید.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد عصاره‌های گال مازو، اثر ضدباکتریایی مناسبی علیه باکتری‌های مورد بررسی دارند. همچنین عصاره متانولی نسبت به عصاره آبی دارای اثر ضدباکتریایی بیشتری بود؛ از این‌رو پیشنهاد می‌گردد در زمینه شناسایی مواد ضدمیکروبی آن در درمان بیماری‌ها به‌عنوان جایگزینی مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌ها، تحقیقات گسترده‌تری صورت گیرد.

کلید واژه‌ها: عصاره گیاهی؛عوامل ضدعفونی؛ *سودوموناس آئروژینوزا*؛ گال مازو؛ گال قلقاف؛ ترکیبات فعال؛ فعالیت ضدباکتریایی.

لطفاً به این مقاله به‌صورت زیر استناد نمایید:

Fatehi S, Mohammadi Sichani M, Tavakoli M. Evaluation of antimicrobial and Anti-quorum sensing activity of mazouj and ghalghaf galls extracts of oak against *Pseudomonas aeruginosa*. Qom Univ Med Sci J 2018;12(10):36-45. [Full Text in Persian]

International License Creative Commons Attribution License 4.0

مقدمه

مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها در میان باکتری‌های بیماریزا، موضوعی است که امروزه به‌عنوان یک مشکل در سراسر جهان مورد توجه قرار گرفته است. استفاده از خاصیت ضدباکتریایی گیاهان، رویکرد جدیدی را در مقابله با مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی و جایگزین شدن با آن‌ها پیش‌رو نهاده است. از گذشته‌های دور به عصاره‌ها و ترکیبات گیاهی با خواص بیولوژیک مختلف توجه زیادی شده است. دستیابی به کاربردهای نوین به‌عنوان داروهای کمکی، پی بردن به ارزش‌های بهداشتی گیاهان و بالاخره کشف مواد مؤثر با خاصیت ضدمیکروبی و مواد ضدتوموری از گیاهان، به پیشرفت طب گیاهی کمک شایانی کرده است (۱). ترکیبات ضدمیکروبی گیاهی نه تنها در درمان بیماری‌های عفونی مؤثرند؛ بلکه به‌طور همزمان فاقد بعضی از اثرات جانبی سایر ترکیبات ضدمیکروبی هستند (۲). گیاهان توانایی نامحدودی برای سنتز ترکیبات آروماتیک دارند و بیشتر این مواد از ترکیبات فنلی و یا مشتقات آن‌ها می‌باشند. این ترکیبات متابولیت‌های ثانویه گیاهان بوده و اثرات درمانی قابل‌توجهی برعلیه ویروس‌ها، باکتری‌ها و قارچ‌ها دارند. امروزه، گونه‌های مختلفی از گیاهان به‌صورت عصاره یا اسانس گیاهی برای درمان عفونت‌های باکتریایی مطرح است (۳). درخت بلوط ازجمله گیاهانی است که در مطالعات بسیاری، خواص دارویی بخش‌های مختلف آن، ازجمله گال‌های آن مورد ارزیابی قرار گرفته است (۵،۴). گال‌ها در اثر رشد غیرطبیعی بافت‌های گیاهی تحت تأثیر عوامل زنده مانند زنبورها بر روی اندام‌های مختلف گیاهان به‌وجود می‌آیند و به‌عنوان ذخیره غذایی برای میزبان خود به‌صورت یک سد، نقش حفاظتی برای آن‌ها ایفا می‌کنند. همچنین گال‌ها به‌صورت یک انبار از ترکیبات تانني و فنلی، دارای خواص ضدمیکروبی هستند (۶). میزان وجود این ترکیبات و خواص ضدمیکروبی آن‌ها در گال‌های مختلف، متفاوت است. مهم‌ترین ماده مؤثره در گال، مازو اسید تانیک است که به مقدار ۷۰-۵۰٪ ترکیبات آن را تشکیل می‌دهد. تانن موجود در گال‌های مازو و قلقاف از بقیه گال‌ها بیشتر بوده و حدود ۵۲٪ می‌باشد (۸،۷). درخت دارمازو نوعی درخت بلوط از جنس *Quercus*، تیره *Fagaceae* و از راسته *Fagales* بوده که وسیع‌ترین رویشگاه آن جنگل‌های آذربایجان غربی، کردستان، کرمانشاه و لرستان است. گال مازو در اثر فعالیت غیرجنسی زنبور *آندریکوس استنلیچتی* (از خانواده *Cynipidae*، زیرخانواده *Cynipinae* و از طایفه *Cynipini*) تولید می‌شود. در شکل شماره ۱، نمونه‌ای از گال مازوی ایجادشده توسط *آندریکوس استنلیچتی* نشان داده شده است. گال قلقاف در اثر فعالیت غیرجنسی زنبور *آندریکوس* کوروستوزا (*Andricus querustozae*) از خانواده *Cynipidae*، بر روی جوانه‌های جانبی یا انتهایی درخت بلوط دارمازو تشکیل می‌شود (۶). در شکل شماره ۲، نمونه‌ای از گال قلقاف ایجادشده به‌وسیله *آندریکوس کوروستوزا* مشاهده می‌شود. این دو گال به‌دلیل داشتن تانن زیاد در طب سنتی، کاربردهای فراوانی دارند (۱۰،۹). در این مطالعه به بررسی فعالیت ضدباکتریایی و ضدکوئرم سنسینگ عصاره‌های گال‌های مازو و قلقاف درخت بلوط دارمازو برعلیه *سودوموناس آئروژینوزا* پرداخته شد.

شکل شماره ۱: گال مازوی سبز

شکل شماره ۲: گال قلقاف

International License Creative Commons Attribution License 4.0

روش بررسی

در این مطالعه، گال‌های مازو و قلقاف در اواخر تابستان سال ۱۳۹۴ از رویشگاه درختان دارمازو واقع در استان لرستان جمع‌آوری شدند. شناسایی و تأیید گال مازو و قلقاف نیز توسط هرباریوم گیاه‌شناسی جهاد کشاورزی استان لرستان صورت گرفت. به‌منظور تهیه عصاره آبی و متانولی، ۳۰ گرم از پودرهای تهیه‌شده از گال مازو و قلقاف به روش سوکسله با استفاده از آب و متانول ۸۵٪ عصاره تهیه گردید. سپس با حذف حلال، خشک و وزن آن اندازه‌گیری شد. پس از خشک شدن عصاره‌ها در مجاورت هوا، عصاره‌های آبی و متانولی تا زمان انجام آزمایش، در ظروف دربسته تیره ودر دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. برای تهیه غلظت‌های مختلف از عصاره‌های آبی و متانولی، ۰/۲ گرم از هر عصاره خشک به دقت وزن و در لوله‌های آزمایش استریل (حاوی ۴ میلی‌لیتر محیط کشت مولر هینتون آگار مذاب همراه با ۲۰٪ DMSO) ریخته شد. محتویات لوله با شیکر مخلوط گردید تا کاملاً حل گردد؛ به این ترتیب عصاره با غلظت ۵۰ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر به دست آمد، سپس مطابق با روش تهیه سری، رقت غلظت‌های ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵ و ۳/۱۲ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر از عصاره تهیه شد.

در این مطالعه، ۵ جدایه بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* از نمونه‌های بالینی ارجاع داده‌شده به آزمایشگاه بیمارستان‌های سطح شهر اصفهان جدا شد. نمونه‌ها ابتدا بر روی محیط مک‌کانکی آگار و بلادآگار کشت داده شدند، سپس آزمون‌های تشخیصی اختصاصی برای تعیین هویت *سودوموناس آئروژینوزا*، ازجمله آزمون‌های بیوشیمیایی اکسیداسیون – فرمانتاسیون (OF)، تولید پیگمان، کاتالاز، اکسیداز و رشد در دمای ۴۲ درجه سانتیگراد به کار برده شدند. همچنین از باکتری استاندارد *سودوموناس آئروژینوزا* (ATCC: ۱۰۷۴) استفاده گردید. نمونه‌های باکتریایی در محیط مولر هینتون براث کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفتند. درادامه، چند قطره از سوسپانسیون باکتری به محیط مولر هینتون براث منتقل شد تا به کدورت معادل ۰/۵ استاندارد مک‌فارلند (غلظت معادل $۱/۵\times۱۰^{۸}$ باکتری در هر میلی‌لیتر) رسید (۱۱).

به‌منظور بررسی فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌ها به روش انتشار چاهک، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تهیه‌شده باکتریایی بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار به‌صورت کاملاً یکنواخت کشت داده شد. سپس چاهک‌هایی به قطر ۶ میلی‌متر بر روی محیط‌های کشت ایجاد شد. از هر رقت تهیه‌شده از عصاره، ۱۰۰ میکرولیتر در هر چاهک ریخته شد و در یک چاهک به‌عنوان کنترل منفی، محلول ۲۰٪ DMSO ریخته شد تا مشخص گردد این حلال فاقد خاصیت ضدمیکروبی است. از سوسپانسیون آنتی‌بیوتیک ایمی‌پنم (با غلظت ۱۰ میکروگرم برمیلی‌لیتر) نیز به‌عنوان شاهد مثبت استفاده گردید. ایمی‌پنم به‌عنوان یک آنتی‌بیوتیک مؤثر و مناسب در درمان عفونت‌های سودوموناسی و سایر باکتری‌های مقاوم در بالین، کاربرد زیادی دارد؛ لذا در مطالعه حاضر از این آنتی‌بیوتیک برای مقایسه فعالیت ضدباکتریایی عصاره‌ها استفاده شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند، سپس قطر هاله عدم رشد اندازه‌گیری شد.

در این مطالعه برای تعیین MIC انواع عصاره‌ها، از روش میکرودایلوشن استفاد گردید. بدین منظور از عصاره‌های متانولی و آبی سری رقت از ۳/۱۲–۵۰ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر تهیه شد، سپس ۱۰۰ میکرولیتر از هر غلظت عصاره به داخل چاهک ستون ۱۰–۱ میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای استریل اضافه گردید (هر ستون به‌ترتیب مربوط به یک غلظت). پس از تلقیح همه چاهک‌ها، جذب نوری نمونه‌ها به‌وسیله دستگاه خواننده ELISA و مطابق با جذب نوری کدورت ناشی از رشد باکتری‌ها در طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت گردید. میکروپلیت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد و پس از ۲۴ ساعت، دوباره جذب نوری چاهک‌ها به‌وسیله دستگاه خواننده ELISA در طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت گردید (۱۳،۱۲).

به‌منظور بررسی فعالیت آنتی‌کوئرم سنسینگ عصاره‌های آبی و متانولی گال‌های مازو و قلقاف، فعالیت ضدبیوفیلمی آنها با روش رنگ‌آمیزی با کریستال‌ویوله مورد بررسی قرار گرفت. در این روش، ابتدا از عصاره، غلظت‌های کمتر از غلظت مهارکنندگی در محیط کشت مولر هینتون براث حاوی ۱٪ گلوکز تهیه گردید.

International License Creative Commons Attribution License 4.0

در ادامه، ۱۰۰ میکرولیتر از هر غلظت عصاره به داخل چاهک‌های ستون ۸-۱ میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای استریل مخصوص کشت بافت افزوده شد (هر ستون به ترتیب مربوط به یک غلظت)، سپس ۱۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی با غلظت $۱/۵\times۱۰^{۱۰}$ باکتری در هر میلی‌لیتر به هر چاهک اضافه شد. پس از تلقیح، جذب نوری چاهک‌ها به‌وسیله دستگاه خواننده ELISA در طول‌موج ۴۵۰ نانومتر قرائت گردید. میکروپلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور قرار داده شدند. پس از این مدت، میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای وارونه گردید تا محتویات آن خالی شود، سپس به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر کریستال‌ویوله ۲٪ اضافه شد و پلیت‌ها به مدت ۵ دقیقه کنار گذاشته شدند. درادامه، رنگ اضافی به‌طور کامل با جریان ملایم آب شسته شد و شست‌وشو تا زمان بی‌رنگ شدن آب ادامه داشت. میکروپلیت در دمای اتاق خشک گردید و بعد از این مرحله برای سنجش میزان رنگ متصل‌شده به جداره‌های چاهک که نمایانگر میزان بیوفیلم بود، به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر استیک اسید گلاسیال اضافه و برای ۲۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفتند. مجدداً جذب نوری چاهک‌ها با دستگاه خواننده ELISA براساس جذب نوری رنگ کریستال‌ویوله در طول‌موج ۴۹۲ نانومتر قرائت گردید. میزان درصد کاهش بیوفیلم از طریق فرمول زیر محاسبه شد (۱۵،۱۴).

$$\text{درصد کاهش بیوفیلم} = \frac{(C-B)-(T-B)}{C-B} \times ۱۰۰$$

در فرمول فوق:

C نشان‌دهنده میانگین OD چاهک‌های کنترل مثبت؛ B نشان‌دهنده میانگین OD چاهک‌های کنترل منفی و T نشان‌دهنده میانگین OD چاهک‌های مورد آزمایش می‌باشد.

یافته‌ها

در این مطالعه، سویه‌های باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* با آزمون رنگ‌آمیزی گرم و آزمون‌های بیوشیمیایی مرسوم شناسایی شدند. همه جدایه‌های مورد بررسی، باسیل گرم منفی، کاتالاز مثبت و اکسیداز مثبت بودند و نتیجه کشت آن‌ها، در محیط کشت اکسیداسیون - فرمانتاسیون (OF) به دست آمد. همچنین این جدایه‌ها پیوسیانین تولید کرده، متحرک بودند و در دمای ۴۲ درجه سانتیگراد رشد داشتند.

حساسیت جدایه‌های بالینی و سویه استاندارد *سودوموناس آئروژینوزا* نسبت به عصارهای متانولی، آبی گال مازو و قلقاف به‌روش انتشار چاهک مورد بررسی قرار گرفت که نتایج مربوطه در جدول شماره ۱ و ۲ ارائه شده است.

جدول شماره ۱: میانگین قطر هاله عدم رشد حاصل از اثر ضدباکتریایی غلظت‌های گوناگون عصاره متانولی و آبی گال مازو بر روی جدایه‌های مختلف *سودوموناس آئروژینوزا* (برحسب میلی‌متر)

نمونه		رقت ۵۰	رقت ۲۵	رقت ۱۲/۵	رقت ۶/۲۵	رقت ۳/۱۲
***سودوموناس آئروژینوزا* (ATCC:۱۰۷٤)**	عصاره متانولی	۱۸/۰±۰/۸۱	۱۴/۱±۰۰/۴۱	۱۰/۰±۰/۰۰	۸/۰۰±۰/۰۰	-
	عصاره آبی	۱۹/۱±۵/۰۰	۱۹/۰±۲۵/۹۵	۱۰/۰±۰۰/۰۰	۸/۵۰±۴/۰۰	-
***سودوموناس آئروژینوزا* جدایه ۱**	عصاره متانولی	۱۹/۰±۲۵/۵۰	۱۶/۰±۰۰/۸۱	۱۲/۱±۵۰/۷۰	۱۱/۰۰±۲/۰۰	-
	عصاره آبی	۱۸/۰±۷۵/۹۵	۱۶/۱±۵/۰۰	۱۱/۱±۲۵/۵۰	۹/۵۰±۱/۰۰	-
***سودوموناس آئروژینوزا* جدایه ۲**	عصاره متانولی	۱۹/۰±۲۵/۹۵	۱۳/۱±۲۵/۲۵	۹/۱±۷۰/۲۵	۸/۲۵±۰/۵۰	-
	عصاره آبی	۱۸/۱±۵/۹۱	۱۳/۲±۷۵/۵۰	۱۰/۰±۰۰/۰۰	۸/۰۰±۰/۰۰	-
***سودوموناس آئروژینوزا* جدایه ۳**	عصاره متانولی	۱۹/۱±۷۵/۲۰	۱۴/۱±۲۵/۷۰	۱۱/۱±۲۵/۵۰	۸/۴±۲۵/۵۰	-
	عصاره آبی	۱۸/۰±۷۵/۵۰	۱۷/۰±۲۵/۵۰	۱۰/۵±۵۰/۷۷	-	-
***سودوموناس آئروژینوزا* جدایه ٤**	عصاره متانولی	۱۹/۰±۰۰/۸۱	۹/۰±۲۰/۹۵	۹/۰±۲۵/۹۵	-	-
	عصاره آبی	۱۸/۲±۰۰/۱۶	۱۳/۱±۵/۰۰	۱۰/۰±۷۵/۵۰	۸/۵۰±۴/۰۰	-
***سودوموناس آئروژینوزا* جدایه ٥**	عصاره متانولی	۱۸/۰±۲۵/۹۵	۹/۱±۰۰/۱۵	۹/۱±۰۰/۱۵	-	-
	عصاره آبی	۱۷/۱±۷۵/۵۰	۱۵/۰±۰۰/۰۰	۸/۰۰±۰/۰۰	-	-

***میانگین قطر هاله عدم رشد آنتی‌بیوتیک ایمی‌پنم، به‌عنوان شاهد مثبت ٤۰ میلی‌متر به دست آمد.**

International License Creative Commons Attribution License 4.0

جدول شماره ۲: میانگین قطر هاله عدم رشد حاصل از اثر ضدباکتریایی غلظت‌های گوناگون عصاره متانولی و آبی گال قلقاف برروی جدایه‌های مختلف *سودوموناس آئروژینوزا* (برحسب میلی‌متر)

نمونه		رقت ۵۰	رقت ۲۵	رقت ۱۲/۵	رقت ۶/۲۵	رقت ۳/۱۲
سودوموناس آئروژینوزا (ATCC:۱۰۷٤)	عصاره متانولی	۱۶/۱±۵/۲۹	۱۰/۱±۷۵/۵۰	۹/۰±۷۵/۵۰	–	–
	عصاره آبی	۱۷/۲±۰۰/۴	۱۴/۰±۷۵/۵۰	۱۰/۰±۰۰/۰۰	۸/۵۰±۰/۵۰	–
سودوموناس آئروژینوزا جدایه ۱	عصاره متانولی	۱۶/۰±۲۵/۵۰	۱۳/۰±۲۵/۵۰	۱۰/۱±۷۵/۲۵	۸/۷۵±۱/۵۰	۸/۲۵±۰/۹۵
	عصاره آبی	۱۸/۱±۲۵/۲۵	۱۵/۰±۰۰/۰۰	۱۰/۰±۷۵/۵۰	۸/۵۰±۰/۵۰	–
سودوموناس آئروژینوزا جدایه ۲	عصاره متانولی	۱۵/۰±۷۵/۹۵	۱۱/۰±۲۵/۹۵	۱۰/۰±۲۵/۹۵	۸/۷۵±۰/۹۵	۷/۵۰±۰/۵۷
	عصاره آبی	۱۹/۱±۵۰/۲۹	۱۶/۰±۰۰/۰۰	۱۴/۱±۲۵/۵۰	۱۲/۷۰±۰/۹۵	۸/۷۵±۰/۵۰
سودوموناس آئروژینوزا جدایه ۳	عصاره متانولی	۱۶/۲±۷۵/۰۶	۱۲/۰±۷۵/۹۵	۱۰/۰±۰۰/۰۰	–	–
	عصاره آبی	۱۹/۲±۰۰/۴۴	۱۸/۰±۰۰/۰۰	۱۷/۰±۰۰/۰۰	۱۶/۰±۰۰/۰۰	۱۱/۲۵±۰/۹۵
سودوموناس آئروژینوزا جدایه ٤	عصاره متانولی	۱۶/۰±۰۰/۸۱	۱۲/۰±۲۵/۵۰	۱۰/۰±۲۵/۵۰	–	–
	عصاره آبی	۱۶/۲±۰۰/۰۰	۱۲/۲±۰۰/۰۰	۸/۵۰±۰/۵۰	–	–
سودوموناس آئروژینوزا جدایه ۵	عصاره متانولی	۱۵/۰±۲۵/۵۰	۱۱/۱±۵/۰۰	۱۰/۰±۰۰/۰۰	–	–
	عصاره آبی	۱۵/۰±۰۰/۰۰	۱۰/۱±۵۰/۰۰	۸/۵۰±۰/۵۰	–	–

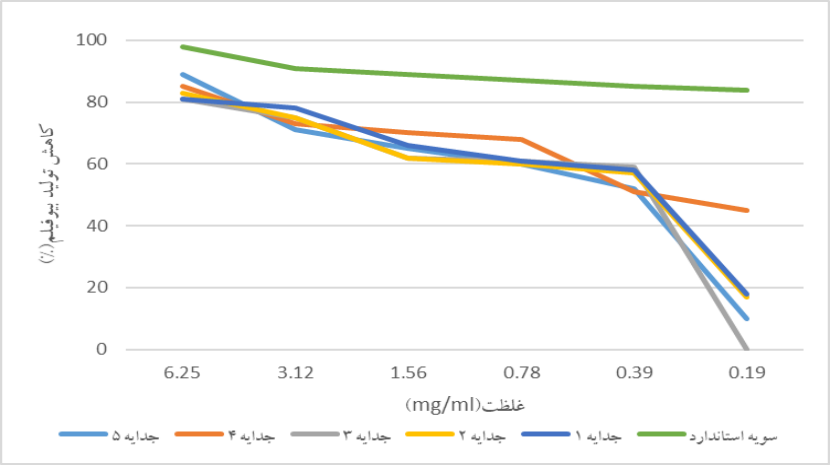
*میانگین قطر هاله عدم رشد آنتی‌بیوتیک ایمی‌پنم، به‌عنوان شاهد مثبت ٤۰ میلی‌متر به دست آمد.

نتایج مربوط به میزان حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره‌های متانولی و آبی گال مازو و قلقاف بر روی جدایه‌های مختلف *سودوموناس آئروژینوزا* در جدول شماره ۳ آمده است.

جدول شماره ۳: مقادیر *MIC* و *MBC* عصاره متانولی و آبی گال مازو بر روی جدایه‌های مختلف *سودوموناس آئروژینوزا* (میلی‌گرم برمیلی‌لیتر)

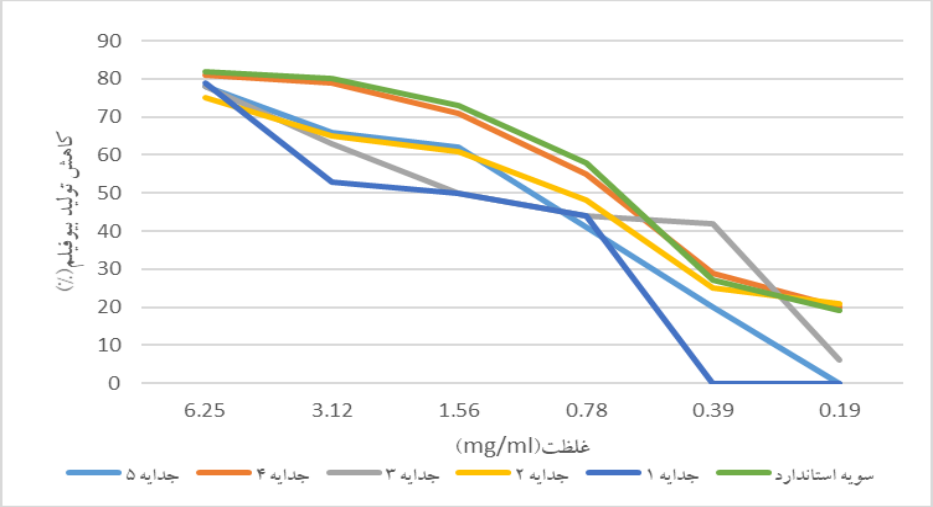
نمونه	عصاره متانولی (MIC)		عصاره آبی (MIC)	
	گال مازو	گال قلقاف	گال مازو	گال قلقاف
سودوموناس آئروژینوزا (ATCC: ۱۰۷٤)	۱۲/۵	۱۲/۵	۱۲/۵	۱۲/۵
سودوموناس آئروژینوزا جدایه ۱	۶/۲۵	۱۲/۵	۱۲/۵	۱۲/۵
سودوموناس آئروژینوزا جدایه ۲	۱۲/۵	۱۲/۵	۱۲/۵	۶/۲۵
سودوموناس آئروژینوزا جدایه ۳	۱۲/۵	۲۵	۱۲/۵	۶/۲۵
سودوموناس آئروژینوزا جدایه ٤	۱۲/۵	۲۵	۱۲/۵	۲۵
سودوموناس آئروژینوزا جدایه ۵	۱۲/۵	۲۵	۲۵	۲۵

در این مطالعه، فعالیت ضدبیوفیلمی عصاره متانولی و آبی گال‌های مازو و قلقاف به روش رنگ‌سنجی با کریستال‌ویوله بر روی *سودوموناس آئروژینوزا* مورد بررسی قرار گرفت که نتایج مربوطه در نمودارهای شماره ۱، ۲، ۳ و ۴ ارائه شده است.

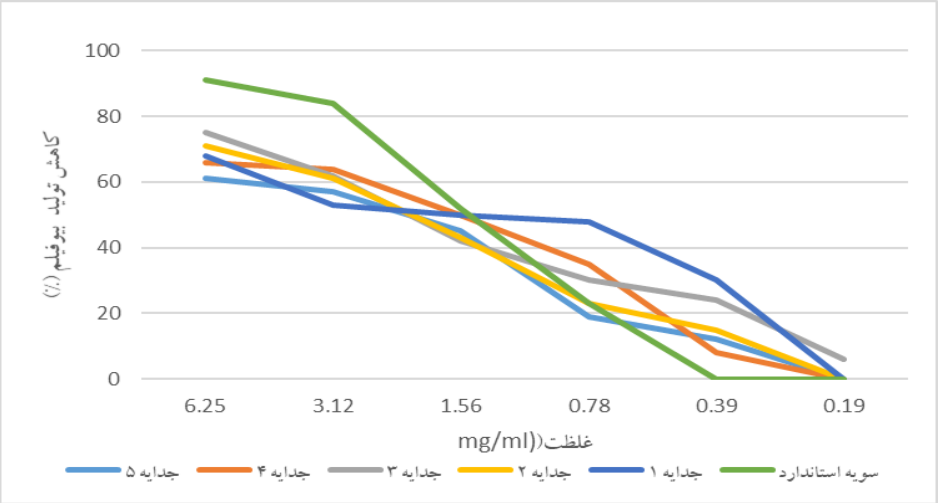


نمودار شماره ۱: درصد کاهش تولید بیوفیلم *سودوموناس آئروژینوزا* در غلظت‌های مختلف عصاره متانولی گال مازو.

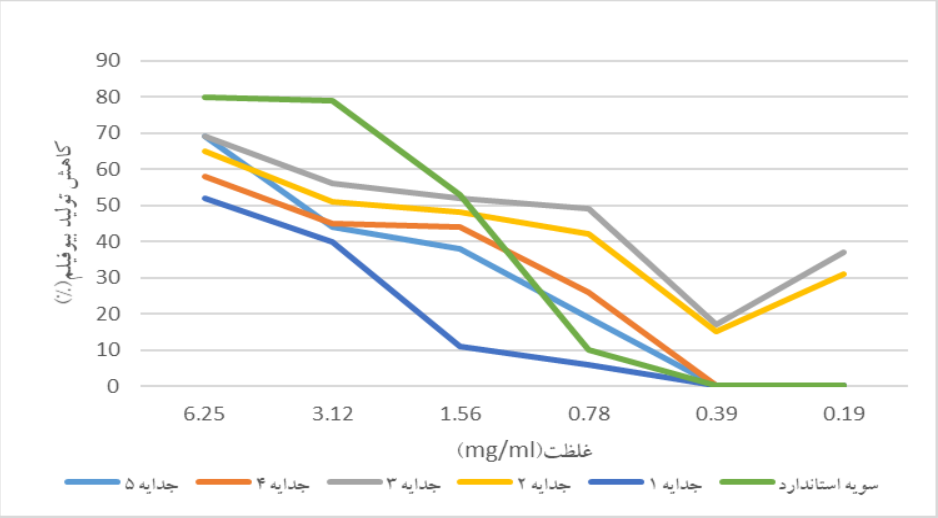
International License Creative Commons Attribution License 4.0



نمودار شماره ۲: درصد کاهش تولید بیوفیلم *سودوموناس آئروژینوزا* در غلظت‌های مختلف عصاره آبی گال مازو.



نمودار شماره ۳: درصد کاهش تولید بیوفیلم *سودوموناس آئروژینوزا* در غلظت‌های مختلف عصاره متانولی گال قلقاف.



نمودار شماره ٤: درصد کاهش تولید بیوفیلم *سودوموناس آئروژینوزا* در غلظت‌های مختلف عصاره آبی گال قلقاف.

International License Creative Commons Attribution License 4.0

در نمودارهای شماره ۱، ۲، ۳ و ۴، درصد کاهش تولید بیوفیلم در حضور غلظت‌های مختلف عصاره متانولی و آبی گال‌های مازو و قلقاف روی جدایه‌های مختلف *سودوموناس آئروژینوزا* نشان داده شده است. با توجه به آزمون آنالیز واریانس دوطرفه، درصد کاهش تولید بیوفیلم با غلظت عصار آبی نسبت مستقیم داشت (p<۰/۰۰۱). به عبارت دیگر، با افزایش غلظت عصاره متانولی و آبی گال‌های مازو و قلقاف، تولید بیوفیلم در *سودوموناس آئروژینوزا* استاندارد و جدایه‌های بالینی کاهش یافت.

بحث

نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد هر دو عصاره متانولی و آبی گال‌های مازو و قلقاف دارای اثر مهاری بر رشد جدایه‌های بالینی و استاندارد *سودوموناس آئروژینوزا* (ATCC:۱۰۷۴) هستند. در همین رابطه، بررسی‌های اولیه محققین تأثیر مهاری عصاره گال‌های قلقاف و مازو را بر رشد انواع باکتری‌ها تأیید کرده‌اند.

در مطالعه چهارمیری و همکاران عصاره آبی گال مازو و قلقاف (در غلظت ۵۰ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر) باعث ایجاد قطر هاله عدم رشد *سودوموناس آئروژینوزا* (ATCC:1074) به ترتیب برابر با ۲۶ و ۱۸ میلی‌متر شد (۱۶). در مطالعه حاضر عصاره آبی گال مازو و قلقاف (در غلظت ۵۰ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر) باعث ایجاد قطر هاله عدم رشد برای *سودوموناس آئروژینوزا* (ATCC:1074) به‌ترتیب ۱۹/۵ و ۱۷ میلی‌متر گردید. مقایسه نتایج نشان می‌دهد عصاره آبی گال مازو و قلقاف در مطالعه چهارمیری دارای اثر ضدباکتریایی بهتری نسبت به مطالعه حاضر بوده و احتمالاً تفاوت مشاهده‌شده در روش عصاره‌گیری می‌باشد. در مطالعه باصری و همکاران نیز عصاره آبی گال مازو روی باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* اثری نداشت (۱۷). در مطالعه حاضر حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره آبی گال مازو روی باکتری *سودوموناس آئروژینوز*، ۱۲/۵ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر گزارش شد. مقایسه نتایج این دو مطالعه نشان می‌دهد برخلاف مطالعه باصری، در مطالعه حاضر عصاره آبی گال مازو اثر مهاری روی *سودوموناس آئروژینوزا* داشته است. در مطالعه داروغا در سال ۲۰۰۹، حداقل غلظت مهاری عصاره آبی و متانولی گال *کورکوس اینفکتوریا* روی *سودوموناس آئروژینوزا*، ۲۵ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر گزارش گردید.

در این مطالعه حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره متانولی و آبی گال مازو، ۱۲/۵ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر بود.

در مطالعه حاضر عصاره مورد نظر در مقایسه با مطالعه داروغا، اثر ضدباکتری بهتری نشان داد.

همچنین در مطالعه موسخازلی و همکاران، میانگین قطر هاله عدم رشد در غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر عصاره‌های متانولی و آبی گال *کورکوس اینفکتوریا* برعلیه باکتری *سلولی میکروبیوم سلولاس* به ترتیب برابر ۱۲/۶ و ۱۲/۱ میلی‌متر به دست آمد (۱۸). در مطالعه حاضر میانگین قطر هاله عدم رشد در غلظت ۵۰ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر عصاره‌های متانولی و آبی گال مازو برعلیه باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* به ترتیب برابر ۱۸ و ۱۹/۵ میلی‌متر بود، همچنین در این مطالعه، اثر ضدباکتریایی بهتری مشاهده گردید و این شاید به دلیل تفاوت در نوع سوش‌های باکتریایی مورد بررسی باشد. نتایج مطالعه موسخازلی نشان داد یک رابطه قوی بین غلظت، نوع عصاره، درجه فعالیت ضدباکتریایی و زمان انکوباسیون آن‌ها وجود دارد.

در مطالعه باصری و همکاران، حداقل غلظت بازدارنده عصاره‌های متانولی گال *کورکوس اینفکتوریا* برعلیه باکتری *استرپتوکوکوس موتانس و استرپتوکوکوس سالیواریوس*، ۰/۶۳ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر گزارش شد (۱۹). در مطالعه حاضر نیز حداقل غلظت بازدارنده عصاره‌های متانولی گال مازو و قلقاف برعلیه باکتری استاندارد *سودوموناس آئروژینوزا*، ۱۲/۵ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر بود؛بنابراین با توجه به نتایج مطالعه حاضر در مقایسه با مطالعه فوق، اثر ضدباکتریایی کمتری نشان داده است که ممکن است تأثیر کمتر عصاره متانولی بر باکتری گرم منفی *سودوموناس آئروژینوزا* نسبت به باکتری‌های گرم مثبت *استرپتوکوکوس موتانس و استرپتوکوکوس سالیواریوس* همان‌گونه که ذکر گردید به‌علت ساختار متفاوت فیزیولوژیک این باکتری بوده و این نتایج قابل‌انتظار است. در سال‌های اخیر، سیستم‌های تنظیمی کوئرم سنسینگ، به دلیل نقش مهمی که در سنتز فاکتورهای حدت بیماریزایی در باکتری‌ها دارند، اهمیت زیادی پیدا کرده‌اند. ارزیابی کشته شدن سلول‌های *سودوموناس آئروژینوزا* ایجادکننده بیوفیلم با غلظت‌های مختلف عصاره‌های گوناگون گال‌های مورد آزمایش به کمک رنگ کریستال‌ویوله، گویای این مطلب است

International License Creative Commons Attribution License 4.0

که غلظت‌های مختلف عصاره‌های متانولی و آبی گال مازو و قلقاف در ممانعت از تشکیل بیوفیلم *سودوموناس آئروژینوزا*، کارایی متفاوتی دارند. نتایج نشان می‌دهد با افزایش غلظت عصاره‌ها، باکتری‌ها قابلیت تولید بیوفیلم خود را از دست می‌دهند. براساس نتایج به‌دست‌آمده، قابلیت عصاره متانولی و آبی گال‌های مازو و قلقاف در کاهش بیوفیلم *سودوموناس آئروژینوزا* تأیید شده است. میزان درصد کاهش بیوفیلم در غلظت ۶/۲۵ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر عصاره متانولی مازو، متانولی قلقاف، آبی مازو و آبی قلقاف در برابر *سودوموناس آئروژینوزا* استاندارد به ترتیب ۹۸، ۹۱، ۸۲ و ۸۰٪ تعیین گردید. در مطالعه محمدی و همکاران نیز میزان درصد کاهش بیوفیلم در غلظت‌های کمتر از غلظت مهارکنندگی (۳/۱۲ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر) عصاره استونی گال *کورکوس اینفکتوریا* در برابر *سودوموناس آئروژینوزا* استاندارد، ۷۰/۱٪ تعیین شد (۲۰).

با مقایسه این دو مطالعه می‌توان به این نتیجه دست یافت که عصاره استونی گال *کورکوس اینفکتوریا* دارای تأثیر بهتری در کاهش بیوفیلم است و این نتیجه شاید به دلیل تفاوت در نوع گال مورد بررسی و در پی آن تفاوت در میزان ترکیبات مؤثره باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد هر دو عصاره متانولی و آبی گال‌های مازو و قلقاف، اثر مهاری در رشد جدایه‌های بالینی و استاندارد *سودوموناس آئروژینوزا* (ATCC:۱۰۷۴) دارند. نتایج حاصله از روش MIC نتایج فوق را تأیید می‌کند. همچنین بررسی غلظت‌های مختلف عصاره بر باکتری‌ها نشان داد با افزایش غلظت عصاره، فعالیت مهاری افزایش می‌یابد که قابلیت عصاره متانولی و آبی گال‌های مازو و قلقاف در کاهش بیوفیلم تأیید شده است. بررسی غلظت‌های مختلف عصاره، نشان‌دهنده افزایش فعالیت مهاری بیوفیلم متناسب با افزایش غلظت عصاره می‌باشد.

References:

1. Koh CL, Sam C-K, Yin WF, Tan LY, Krishnan T, Chong YM, et al. Plant-derived natural products as sources of Anti-Quorum sensing compounds. Sensors (Basel) 2013;13(5):6217-28. PubMed

2. Kokoska L, Polesny Z, Rada V, Nepovim A, Vanek T. Screening of some Siberian medicinal plants for antimicrobial activity. J Ethnopharmacol 2002;82(1):51-3. PubMed

3. Limsuwan S, Subhadhirasakul S, Voravuthikunchai SP. Medicinal plants with significant activity against important pathogenic bacteria. Pharm Bio 2009;47(8):683-9. Link

4. Stone GN, Schönrogge K, Atkinson RJ, Bellido D, Pujade-Villar J. The population biology of oak gall wasps(Hymenoptera: Cynipidae). Annu Rev Entomol 2002;47:633-68. PubMed

5. Jalilian Tabar F, Lorestani AN, Gholami R, Behzadi A, Fereidoni M. Physical and mechanical properties of Oak (Quercus Persica) fruits. Agric Eng Int 2011;13(4):1-4. Link

6. Sadeghi S, Melika G, Pujade-Villar J, Penzes Z, Acs Z, Bechtold M, et al. Oak cynipid gall inquilines of Iran (Hym.: Cynipidae: Synergini), with description of new species. J Entomol Society Iran 2006;25(2):15-50. Link

7. Taherpour A, Hashemi A, Erfanimanesh 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. PubMed

8. Rao N, Mittal S, Sudhan S, Menghani E. In vitro Phytochemical screening, antioxidant & antimicrobial activity of the methanolic extract of Quercus infectoria L. Int J Pharm Sci 2013;5(2):273-7. Link

International License Creative Commons Attribution License 4.0

9. Khennouf S, Benabdallah H, Gharzouli K, Amira S, Ito H, Kim T, et al. Effect of tannins from Quercus suber and Quercus coccifera leaves on ethanol-induced gastric lesions in mice. J Agri Food Chem 2003;51(5):1469-73. PubMed

10. Hamid H, Kaur G, Abdullah S, Ali M, Athar M, Alam M. Two New Compounds from the galls of quercus infectoria with Nitric Oxide and superoxide inhibiting ability. Pharm Biol 2005;43(4):317-23. PubMed

11. Balouiri M, Sadiki M, Ibnsouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. J Pharm Anal 2016;6(2):71-9. PubMed

12. Wiegand I, Hilpert K, Hancock REW. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. Nat Protoc 2008;3(2):163-75. PubMed

13. Valgas C, Souza SM de, Smânia EFA, Smânia Jr A. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. Braz J Microbiol 2007;38(2):369-80. Link

14. Pitts B, Hamilton MA, Zelver N, Stewart PS. A microtiter-plate screening method for biofilm disinfection and removal. J Microbiol Meth 2003;54(2):269-72. PubMed

15. Abdi-Ali A, Hendiani S, Mohammadi P, Gharavi S. Assessment of Biofilm Formation and Resistance to Imipenem and Ciprofloxacin among Clinical Isolates of Acinetobacter baumannii in Tehran. Jundishapur J Microbiol 2014;7(1):e8606. PubMed

16. Chaharmiri Dokhaharani S, Karbasizadeh V, Mohammadi-Sichani M, Tavakoli M. Antibacterial activity of aqueous extracts of Mazuj and Ghalghaf galls of Quercus infectoria in Lorestan forests. Yafteh 2013;15(2):43-51. [Full Text in Persian] Link

17. Basri DF, Fan SH. The potential of aqueous and acetone extracts of galls of Quercus infectoria as antibacterial agents. Indian J Pharmacol 2005;37(1):26-9. Link

18. Muskhazli M, Nurhafiza Y, Nor Azwady AA, Nor Dalilah E. Comparative Study on the in vitro antibacterial efficacy of aqueous and methanolic extracts of quercus infectoria gall`s against cellulosimicrobium cellulans. J Bio Sci 2008;8:634-8. Link

19. Basri DF, Tan LS, Shafiei Z, Mohamad Zin N. In Vitro antibacterial activity of galls of quercus infectoria olivier against oral pathogens. Evid Base Complement Alter Med 2012;632796:1-6. Link

20. Mohammadi-Sichani M, Karbasizadeh V, Chaharmiri Dokhaharani S. Effect of oak galls extracts on streptococcus mutans growth and biofilm formation. J Mazandaran Univ Med Sci 2015;24(121):161-71. [Full Text in Persian] Link

International License Creative Commons Attribution License 4.0