

Research Paper:

The Effects of Ethanol and Methanol Extracts of Ziziphus Spina-christi, Peganum Harmala, Salvia Officinalis, and Quercus Brantii on the Growth and Biofilm Formation by Staphylococcus Aureus in Vitro



Maryam Monadi¹ , Hosein Motamedi^{1,2} , *Nazanin Sanei¹ 

1. Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

2. Biotechnology and Biological Science Research Center, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.



Citation Monadi M, Motamedi H, Sanei N. The Effects of Ethanol and Methanol Extracts of Ziziphus Spina-christi, Peganum Harmala, Salvia Officinalis, and Quercus Brantii on the Growth and Biofilm Formation by Staphylococcus Aureus in Vitro. Qom University of Medical Sciences Journal. 2021; 15(7):482-489. <https://doi.org/10.32598/qums.15.7.2224.1>

 <https://doi.org/10.32598/qums.15.7.2224.1>



Received: 16 Dec 2020

Accepted: 22 Sep 2021

Available Online: 01 Oct 2021

Keywords:

Anti biofilm effect,
Medicinal plants,
Salvia officinalis,
Staphylococcus au-
reus, Ethanol extract,
Methanol extract

ABSTRACT

Background and Objectives: Medicinal plants are one of the most important natural resources in each country. The aim of this study was to evaluate the anti-biofilm effect of ethanol and methanol extracts of Ziziphus spina-christi leaves, Peganum harmala, Salvia officinalis, and Quercus brantii on the growth and formation of biofilm by Staphylococcus aureus.

Methods Following evaluation of the susceptibility of the studied Staphylococcus aureus strain to various antibiotics, the growth inhibitory effect of extracts on the bacterium was investigated by disc diffusion method and then the inhibitory effect of the extracts on biofilm formation was evaluated in 96 well micro-titer plates. The means were compared with ANOVA test.

Results The results from antibacterial effect of the extracts showed that the methanol extract of Peganum harmala and Quercus brantii seeds at 350 and 450 mg/ml concentrations had a greater inhibitory effect on the growth of Staphylococcus aureus than other extracts as well as synthetic antibiotics. The results from anti-biofilm formation effect of the extracts showed that methanol extract of Salvia officinalis leaves and Quercus brantii seeds at 350 mg/ml concentration, and ethanol extract of Salvia officinalis leaves at 350 mg/ml concentration were the lowest concentrations that showed the greatest inhibitory effect on biofilm formation by Staphylococcus aureus. Other extracts inhibited biofilm formation by this bacterium in higher concentrations. The lowest anti-biofilm effect on Staphylococcus aureus was observed by ethanolic and methanolic extracts of Ziziphus spina-christi leaf.

Conclusion The studied extracts in this study, especially the methanol extracts of Salvia officinalis leaves and Peganum harmala seeds, and ethanol extract of Salvia officinalis leaves are good solutions for S. aureus infection and biofilms formation control and are suggested that be evaluated in In vivo experiments and clinical applications.

* Corresponding Author:

Nazanin Sanei

Address: Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

Tel: +98 (912) 0385389

E-Mail: rockdigo693@gmail.com

مقاله پژوهشی:

اثر عصاره‌های اتانولی و متانولی گیاهان سدر، اسفند، مریم گلی و بلوط بر تشکیل بیوفیلیم توسط استافیلوکوکوس اورئوس در شرایط برون تنی

مریم منادی^۱، حسین معتمدی^{۱،۲}، نازنین صانعی^۱

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.
۲. مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی و علوم زیستی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: گیاهان دارویی از مهم‌ترین منابع طبیعی هر کشور هستند. هدف مطالعه حاضر بررسی اثر ضد بیوفیلیمی عصاره‌های اتانولی و متانولی برگ سدر، دانه اسفند، برگ مریم گلی و دانه بلوط بر رشد و تشکیل بیوفیلیم استافیلوکوکوس اورئوس است.

روش بررسی: عصاره‌های گیاهی با روش خیساندن در اتانول و متانول تهیه شدند. پس از ارزیابی میزان حساسیت استافیلوکوکوس اورئوس به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها، اثر مهارکنندگی عصاره‌ها با روش انتشار دیسک بررسی و سپس اثر بازدارندگی عصاره‌ها بر تشکیل بیوفیلیم توسط این باکتری در چاهک‌های پلیت میکروتیتزر ۹۶ خانه‌ای ارزیابی شد. میانگین‌ها با آزمون ANOVA مقایسه شد.

یافته‌ها: عصاره متانولی دانه‌های اسفند و بلوط در غلظت‌های ۳۵۰ و ۴۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر، اثر بازدارندگی بیشتری بر استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به سایر عصاره‌ها و آنتی‌بیوتیک‌های سنتزی دارد. غلظت ۳۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره‌های متانولی برگ مریم گلی و دانه اسفند و غلظت ۳۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره اتانولی برگ مریم گلی، کمترین غلظتی بودند که بیشترین اثر مهارتی بر تشکیل بیوفیلیم توسط استافیلوکوکوس اورئوس نشان دادند. عصاره‌های دیگر در غلظت‌های بالاتر تشکیل بیوفیلیم را مهار کردند. کمترین اثر ضد بیوفیلیمی توسط عصاره‌های اتانولی و متانولی برگ سدر مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: عصاره‌های مورد بررسی، به‌خصوص عصاره متانولی برگ مریم گلی و دانه اسفند و عصاره اتانولی برگ مریم گلی گزینه‌های مناسبی برای کنترل بیوفیلیم‌های استافیلوکوکی هستند و بررسی‌های درون تنی برای کاربرد بالینی آنها پیشنهاد می‌شود.

تاریخ دریافت: ۲۶ آذر ۱۳۹۹

تاریخ پذیرش: ۳۱ شهریور ۱۴۰۰

تاریخ انتشار: ۹ مهر ۱۴۰۰

کلیدواژه‌ها:

اثر ضد بیوفیلیم،
گیاهان دارویی، مریم
گلی، استافیلوکوکوس
اورئوس، عصاره اتانولی،
عصاره متانولی

مقدمه

مقاومت باکتری‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها که با سازوکارهای پیچیده و هوشمندی ایجاد می‌شود، از جمله مهم‌ترین معضلات دهه‌های اخیر است که سیستم‌های پزشکی و درمانی را درگیر کرده است؛ بنابراین یافتن ترکیبات ضد میکروبی جدید با کمترین اثرات جانبی، همواره ذهن محققان را به خود معطوف ساخته است [۱].

گیاهان به سبب داشتن ترکیبات شیمیایی مانند آلکالوئیدها، گلوکوزیدها، ترپن‌ها، ساپونین‌ها، تانن‌ها و هورمون‌ها دارای سازوکارهای خاص دفاعی به صورت اندوژن در خود هستند و می‌توانند منبع بالقوه و عظیمی از ترکیبات ضد میکروبی به حساب

آیند [۲]. از طرف دیگر، داروهایی که از منابع طبیعی مانند گیاهان تهیه می‌شوند، به دلیل سادگی فناوری تولید، مقرون به صرفه بودن و عوارض کمتر، در سال‌های اخیر مورد توجه بیشتری قرار گرفته‌اند [۳].

بیوفیلیم‌ها اجتماعات میکروبی هستند که در آن‌ها سلول‌های میکروبی در یک ماتریکس خارج سلولی محصور شده‌اند و از طریق شبکه‌ای از کانال‌های داخلی با یکدیگر در ارتباط هستند. در ساختار پلیمر خارج سلولی، پلیساکارید، پروتئین، فسفولیپید، تیکوئیک اسید و پلیمرهای هیدراته دیگر وجود دارد. این پلیمرها در انتقال مواد غذایی و اتصال باکتری‌های موجود در بیوفیلیم به سطوح نقش دارند و همچنین، موجب افزایش مقاومت این باکتری‌ها نسبت به شرایط دشوار محیطی و عوامل باکتری کش می‌شوند [۴، ۵].

* نویسنده مسئول:

نازنین صانعی

نشانی: اهواز، دانشگاه شهید چمران اهواز، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی.

تلفن: ۰۲۸۵۳۸۹-۹۸ (۹۱۲)

رایانامه: rockdigo693@gmail.com

محرك سیستم ایمنی استفاده می‌شود. گیاه بلوط با نام علمی *Quercus Brantii*، متعلق به خانواده *Fagaceae* است و برای درمان زخم معده، ورم معده و پادزهر برای مسمومیت‌های ناشی از آلکالوئیدها و فلزات استفاده می‌شود [۹-۱۱].

هدف از مطالعه حاضر ارزیابی اثر عصاره‌های اتانولی و متانولی چهار گیاه سدر، اسفند، مریم گلی و بلوط بر تشکیل بیوفیلیم باکتری استافیلوکوکوس اورئوس است.

روش بررسی

گیاهان مورد استفاده

گیاهان مورد استفاده در مطالعه حاضر از مناطق مختلف استان خوزستان تهیه شدند. بخش‌های گیاهی مورد استفاده شامل برگ گیاه سدر جمع‌آوری شده از اطراف شهر اهواز، دانه گیاه اسفند جمع‌آوری شده از اطراف شهر بهبهان، برگ گیاه مریم گلی و دانه گیاه بلوط جمع‌آوری شده از اطراف شهر مسجد سلیمان بودند. گیاهان جمع‌آوری شده در هر بار یوم آزمایشگاه گیاه‌شناسی دانشگاه شهید چمران اهواز شناسایی شدند.

آماده‌سازی عصاره‌های گیاهی

قسمت‌های مختلف گیاهان در آون با دمای چهل درجه سانتی‌گراد خشک و پودر شدند. سپس یک گرم از هر گیاه پودر شده در ده میلی‌لیتر از حلال‌های اتانول و متانول ۸۰ درصد حجمی / حجمی در آب جداگانه خیسانده شدند. پس از پانزده دقیقه سانتریفیوژ در دور ۳۰۰۰ rpm، سوپرناتانت‌ها جمع‌آوری شدند. این فرایند سه بار تکرار شد و عصاره‌ها در دمای اتاق برای تبخیر حلال قرار داده شدند [۱۲].

بررسی اثر ضد میکروبی به روش انتشار از دیسک

غلظت‌های ۱۵۰، ۲۵۰، ۳۵۰ و ۴۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از هر عصاره گیاهی تهیه و اثر ضد میکروبی آن به روش انتشار دیسک بررسی شد. برای این منظور از کشت ۲۴ ساعته باکتری استافیلوکوکوس اورئوس (*Staphylococcus Au-* ATCC6538 reus) سوسپانسیونی با کدورت معادل ۰/۵ مک فارلند (جذب نوری ۰/۰۱ در طول موج ۶۲۰ نانومتر) تهیه و با استفاده از سواب استریل روی پلیت‌های حاوی محیط مولر هینتون آگار کشت چمنی داده شد. دیسک‌های بلاتک استریل با غلظت‌های مختلف از هر عصاره اشباع شد و روی کشت تهیه‌شده قرار گرفت. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قطر هاله‌های عدم رشد اندازه‌گیری شد.

از دیسک‌های بلاتک آغشته به حلال به منظور اثر حلال به تنهایی بر باکتری به عنوان شاهد منفی استفاده شد. هم‌زمان حساسیت باکتری فوق نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های

بیوفیلیم‌ها در محیط‌های مختلف، از جمله سیستم‌های آب صنعتی، تجهیزات پزشکی و دستگاه‌های مورد استفاده در صنایع غذایی تشکیل می‌شوند و در بیمارستان‌ها می‌توانند باعث آلودگی وسایل و تجهیزات و در نتیجه، انتقال عفونت‌های بیمارستانی شوند. به دلیل مقاومت بالای باکتری‌های موجود در بیوفیلیم نسبت به عوامل باکتری‌کش و ضد عفونی‌کننده‌ها، پاک کردن آنها از سطوح در مقایسه با باکتری‌های آزاد مشکل‌تر است [۵، ۶]. و این امر موجب تلاش برای یافتن روش‌های مختلف برای کنترل و حذف بیوفیلیم‌ها در محیط‌های صنعتی، غذایی و تجهیزات پزشکی شده که حضور جمعیت‌های میکروبی در آن‌ها مشکل‌زا است [۷].

برای این منظور راهبردهای مختلفی با استفاده از روش‌های فیزیکی و شیمیایی پیشنهاد شده و علاوه بر آن، در سال‌های اخیر استفاده از روش‌های بیولوژیک کارآمد برای کنترل بیوفیلیم‌های باکتریایی به دلیل اثرات مخرب کمتر آنها بر سلامت انسان، حیوان و محیط زیست توصیه شده است [۶].

استافیلوکوکوس اورئوس از عوامل اصلی عفونت‌های بیمارستانی با شیوع بالا است. این باکتری سبب ایجاد طیف وسیعی از بیماری‌ها، از جمله اندوکاردیت، استئومیلیت، پنومونی، سندرم شوک سمی، کورک و دمل می‌شود. در بسیاری از موارد منشأ عفونت کارکنانی هستند که در بینی خود ناقل این باکتری هستند. تحقیقات نشان می‌دهند میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی بین سویه‌های مختلف استافیلوکوکوس اورئوس بین ۷۰ درصد تا ۹۰ درصد است [۸].

این باکتری یکی از عوامل مهم تشکیل بیوفیلیم بر تجهیزات پزشکی، از جمله سوند و کاتتر است و به همین دلیل کنترل و ریشه‌کنی آن در این مکان‌ها از اهمیت بسزایی برخوردار است [۵]؛ بنابراین یافتن منابع جدید که قادر به کنترل بیوفیلیم ناشی از این پاتوژن باشند، مانند منابع گیاهی، ضروری است و می‌تواند فراوانی عفونت‌های بیمارستانی ناشی از این باکتری را کاهش دهد.

گیاه سدر با نام علمی *Ziziphus Spina-christi* متعلق به خانواده *Rhamnaceae* است. این گیاه جزء گیاهان همیشه سبز بومی شمال، منطقه گرمسیری آفریقا و جنوب و غرب آسیا است و در این مناطق به عنوان داروی آرام‌بخش برای درمان بی‌خوابی و تپش قلب استفاده می‌شود. گیاه اسفند با نام علمی *Peganum Harmala* متعلق به خانواده *Nitrariaceae* است. این گیاه بومی مناطق شرقی ایران و غرب هند است و جهت درمان درد، التهاب پوست و همچنین سرطان پوست استفاده می‌شود.

گیاه مریم گلی با نام علمی *Salvia Officinalis*، خانواده *Lamiaceae* است. از این گیاه به عنوان داروی ضد آلزایمر، ضد سرطان، آرام‌بخش، ضد میکروب، آنتی‌اکسیدان، کاهش‌دهنده قند خون و

تتراسایکلین، استرپتومایسین، کلرامفنیکل، سیپروفلوکساسین، کاربنیسیلین، جنتامایسین، ونکومایسین، پنسیلین، نیتروفرانتوئین و اریترومایسین مشابه روش ذکر شده برای عصاره تعیین شد [۱۳].

بررسی اثر عصاره بر تشکیل بیوفیلم

ابتدا مقدار ۱۹۰ میکرولیتر از هریک از محیط‌های کشت به شرح ذیل در چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه استریل تهیه شد. در چاهک اول محیط کشت بدون عصاره برای تهیه شاهد مثبت و در چاهک‌های دوم تا پنجم محیط‌های کشت حاوی عصاره گیاهی به ترتیب با غلظت‌های ۱۵۰، ۲۵۰، ۳۵۰ و ۴۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر ریخته شد. یک چاهک حاوی محیط کشت بدون عصاره نیز به عنوان شاهد منفی در نظر گرفته شد. سپس از کشت ۲۴ ساعته باکتری استافیلوکوکوس اورئوس سوسپانسیون میکروبی با کدورت معادل استاندارد ۰/۵ مک فارلند در محیط کشت مولر هینتون براث تهیه شد و به مقدار ده میکرولیتر از آن به هر چاهک، به استثنای چاهک شاهد منفی اضافه شد.

پلیت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به منظور تشکیل بیوفیلم باکتریایی گرماگذاری شد. بعد از گذشت طول دوره گرماگذاری، محتویات پلیت تخلیه شد و چاهک‌ها سه بار با آب مقطر استریل شست‌وشو داده شد. سپس دویست میکرولیتر از محلول سافرانین ۰/۰۲۵ درصد وزنی / حجمی در آب مقطر به آن اضافه شد و پس از دو دقیقه با آب مقطر استریل شست‌وشو داده شد. در نهایت، دویست میکرولیتر محلول اتانول استون با نسبت ۵۰ / ۵۰ حجمی به هر چاهک اضافه شد و

بعد از پانزده دقیقه جذب نوری محتویات چاهک‌ها با دستگاه خوانش الیزا در طول موج ۴۹۲ در مقابل چاهک شاهد منفی (بدون باکتری) خوانده شد. افزایش رنگ جذب شده به جداره‌های چاهک نشان دهنده افزایش تشکیل بیوفیلم بود که در نتیجه، پس از اضافه کردن الکل استون، رنگ بیشتری نیز تولید می کرد و نهایتاً جذب بیشتری در دستگاه خوانش الیزا ثبت می شد [۱۴]. برای مقایسه میانگین‌ها از آنالیز واریانس ANOVA استفاده شد.

یافته‌ها

نتایج تست حساسیت استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به آنتی بیوتیک‌ها

جدول‌های شماره ۱ و ۲ به ترتیب نتایج تعیین حساسیت باکتری استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به عصاره‌ها و آنتی بیوتیک‌های استفاده شده را نشان می دهد. عصاره متانولی بلوط با قطر هاله ۳۶ میلی متر در غلظت‌های ۳۵۰ و ۴۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر، اثر بیشتری نسبت به آنتی بیوتیک‌های سنتزی حتی ونکومایسین (که بیشترین اثر بازدارندگی را نسبت به سایر آنتی بیوتیک‌های سنتزی داشت) نشان داد.

عصاره متانولی اسفند در غلظت‌های ۳۵۰ و ۴۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر با قطر بازدارندگی به ترتیب معادل ۳۲ و ۳۴ میلی متر، اثر بازدارندگی بیشتری نسبت به ونکومایسین و سایر آنتی بیوتیک‌های سنتزی داشت. همان طور که در **جدول شماره ۱** مشاهده می شود، اثر ضدباکتریایی عصاره اتانولی سدر بیشتر از عصاره متانولی آن بود. در صورتی که در مورد گیاهان اسفند،

جدول ۱. نتایج اثر بازدارندگی عصاره‌های گیاهان مورد مطالعه بر رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 6538) با روش انتشار از دیسک

عصاره	قطر هاله بازدارنده رشد (میلی متر)				شاهد منفی
	غلظت ۱۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر	غلظت ۲۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر	غلظت ۳۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر	غلظت ۴۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر	
عصاره اتانولی سدر	۱۰	۱۰	۱۲	۱۳	۰
عصاره متانولی سدر	۸	۱۰	۱۱	۱۳	۰
عصاره اتانولی اسفند	۱۷	۲۰	۲۵	۲۶	۰
عصاره متانولی اسفند	۲۵	۳۰	۳۲	۳۴	۰
عصاره اتانولی بلوط	۹	۱۳	۱۵	۲۵	۰
عصاره متانولی بلوط	۳۳	۳۵	۳۶	۳۶	۰
عصاره اتانولی مریم گلی	۱۰	۱۳	۱۵	۱۸	۰
عصاره متانولی مریم گلی	۱۴	۱۷	۱۸	۱۸	۰

جدول ۲. نتایج تست حساسیت استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 6538) نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی با روش انتشار از دیسک

آنتی‌بیوتیک	TE	C	CP	CAR	CN	V	PEN	F	S	E
قطر هاله بازدارنده رشد (میلی‌متر)	۱۶	۲۲	۲۸	۲۴	۲۰	۳۰	۲۰	۲۰	۲۲	۲۸

TE: تتراسایکلین (سی میکروگرم)، C: کلرامفنیکل (سی میکروگرم)، CP: سیپروفلوکسازین (پنج میکروگرم)، CAR: کاربنی‌سیلین (صد میکروگرم)، جنتامایسین (ده میکروگرم)، V: ونکومایسین (سی میکروگرم)، PEN: پنی‌سیلین (ده واحد)، F: نیتروفوران‌توئین (سی میکروگرم)، S: (ده میکروگرم)، E: اریترومایسین (پانزده میکروگرم).

به سایر عصاره‌ها موجب مهار کامل تشکیل بیوفیلم توسط استافیلوکوکوس اورئوس شدند. عصاره متانولی بلوط تشکیل بیوفیلم توسط باکتری را به طور معنادار نسبت به شاهد مثبت کاهش داد، اما به طور کامل مهار نکرد و عصاره متانولی سدر قادر به مهار تشکیل بیوفیلم توسط باکتری نبود.

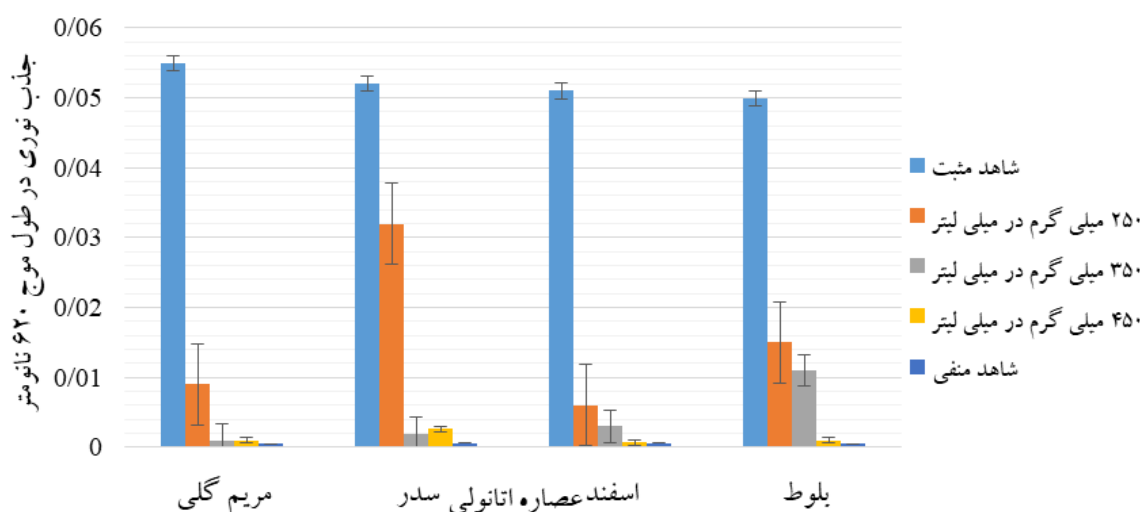
بحث

عفونت‌های باکتریایی همچنان یک مشکل مهم بهداشتی در سراسر جهان هستند. خطر بروز عفونت از دستگاه‌های پزشکی، مانند پروتز ارتوپدی، دستگاه الکترونیکی قلب، دریچه‌های قلب مصنوعی یا کاتترهای وریدی افزایش می‌یابد. علل اصلی عفونت باکتریایی مرتبط با دستگاه، گونه‌های استافیلوکوکوس، انتروکوکوس فکالیز و سودوموناس آئروژینوزا هستند [۱۷-۱۵].

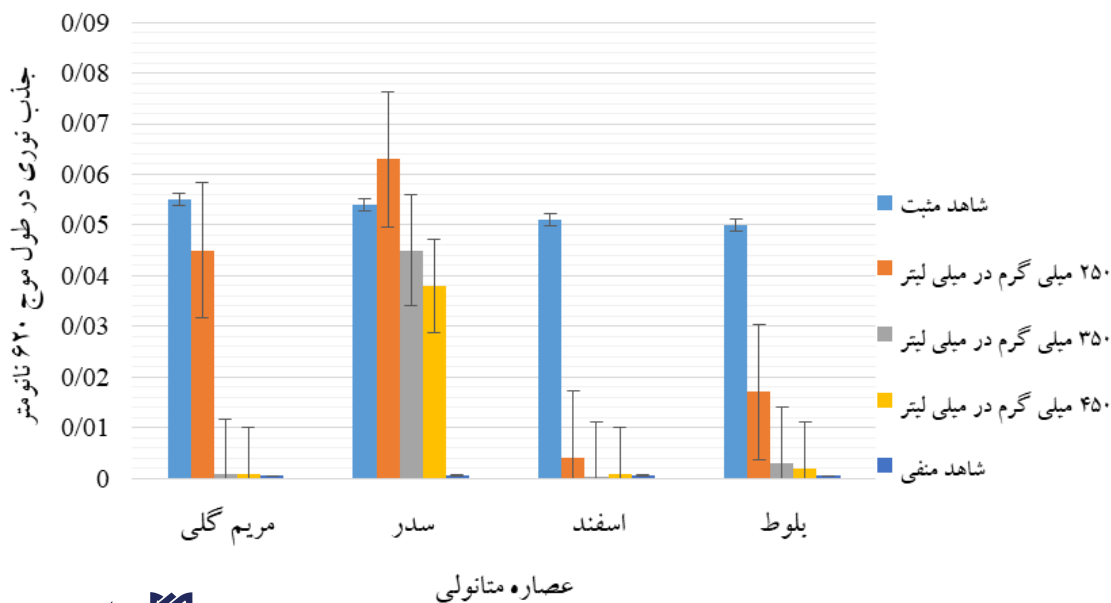
استافیلوکوکوس اورئوس یکی از مهم‌ترین پاتوژن‌هایی است که می‌تواند باعث عفونت‌های متنوع از عفونت‌های ساده پوستی

بلوط و مریم گلی، عصاره‌های متانولی تأثیر بیشتری بر مهار رشد باکتری داشت. پس از افزودن عصاره‌های گیاهی روند تشکیل بیوفیلم در پلیت ۹۶ خانه بررسی شد که نتایج آن در تصویر شماره ۱ برای عصاره اتانولی و تصویر شماره ۲ برای عصاره متانولی مشاهده می‌شود. از بین عصاره‌های اتانولی، غلظت ۳۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره مریم گلی کمترین غلظتی از عصاره‌ها بود که با اختلاف معناداری نسبت به سایر عصاره‌ها موجب مهار تشکیل بیوفیلم توسط استافیلوکوکوس اورئوس شد. پس از آن عصاره‌های اتانولی اسفند و بلوط هر دو با غلظت ۴۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر تشکیل بیوفیلم توسط باکتری را به طور کامل مهار کردند. عصاره اتانولی سدر قادر به مهار کامل تشکیل بیوفیلم توسط باکتری نبود، اما نسبت به شاهد مثبت به طور معناداری تشکیل بیوفیلم را کاهش داد.

از بین عصاره‌های متانولی، عصاره مریم گلی و اسفند با غلظت ۳۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر با اختلاف معناداری نسبت



تصویر ۱. میانگین جذب نوری چاهک‌ها پس از اضافه کردن غلظت‌های مختلف عصاره‌های اتانولی به بیوفیلم استافیلوکوکوس اورئوس چاهک مربوط شاهد مثبت حاوی محیط کشت و باکتری (بدون عصاره) و چاهک مربوط به شاهد منفی حاوی محیط کشت بدون باکتری و بدون عصاره است.



مجله
دانشگاه علوم پزشکی قم

تصویر ۲. میانگین جذب نوری چاهک‌ها پس از اضافه کردن غلظت‌های مختلف عصاره‌های متانولی به بیوفیلیم استافیلوکوکوس اورئوس چاهک مربوط شاهد مثبت حاوی محیط کشت و باکتری (بدون عصاره) و چاهک مربوط به شاهد منفی حاوی محیط کشت بدون باکتری و بدون عصاره است.

درحالی‌که در مطالعه حاضر اثر عصاره‌های چند گیاه بر رشد و تشکیل بیوفیلیم باکتری بررسی شد و عصاره‌گیری با استفاده از دو حلال اتانول و متانول انجام شد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که عصاره متانولی نسبت به عصاره اتانولی بر مهار بیوفیلیم باکتری اثر بیشتری دارد [۲۰].

دلیل انتخاب گیاهان فوق برای انجام مطالعه حاضر این بود که در مطالعه قبلی اثر ضدباکتریایی آنها علیه سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین به اثبات رسیده بود و مطالعه حاضر در پی آن بود تا اثر ضد بیوفیلیمی عصاره این گیاهان را بررسی کند. شجاعی مقدم و همکاران فعالیت ضدباکتریایی عصاره اتانولی هشت گیاه بلوط، اسفند، سدر، لعل کوهستان، جفجفک، بید هندی، مریم گلی و شیر پنیر را علیه سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین و سفکسیم به روش دیسک دیفیوژن بررسی کردند. بیشترین اثر ضدباکتریایی به ترتیب مربوط به بلوط، اسفند، سدر و لعل کوهستان بود و عصاره‌های جفجفک و بید هندی اثر ضدباکتریایی متوسط داشتند [۲۱].

در مطالعه حاضر غلظت ۳۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره‌های متانولی مریم گلی و اسفند و همین غلظت از عصاره اتانولی مریم گلی، کمترین غلظت‌هایی بودند که بیشترین اثر مهاری را بر تشکیل بیوفیلیم نشان دادند و این در حالی بود که عصاره‌های دیگر نیز در غلظت‌های بالاتر تشکیل بیوفیلیم را مهار کردند. عصاره‌های اتانولی و متانولی سدر کمترین اثر مهاری را بر تشکیل بیوفیلیم

مانند دمل و کورک گرفته تا بیماری‌های تهدیدکننده زندگی مانند مننژیت، استئومیلیت و اندوکاردیت شود [۵، ۱۸]. این باکتری به عنوان تهدید مهمی در دام‌پزشکی و عامل بیماری‌های جدی در دام و حیوانات خانگی نیز مطرح است [۱۹].

یکی از مهم‌ترین فاکتورهای حداث استافیلوکوکوس اورئوس، توانایی تشکیل بیوفیلیم است. عفونت‌های بیوفیلیمی معمولاً مزمن و برگشت‌پذیر بوده و به سختی به درمان پاسخ می‌دهند. آنتی‌بیوتیک‌های تجاری زیادی در سراسر جهان برای کنترل این عفونت‌ها در انسان استفاده می‌شوند. استفاده طولانی‌مدت از این آنتی‌بیوتیک‌ها باعث ظهور باکتری‌های مقاوم به چند دارو شده و مشکلات زیادی در درمان بیماری‌های عفونی ایجاد کرده است؛ بنابراین لازم است روی کشف مواد ضد میکروبی جدید تحقیقات گسترده‌ای صورت گیرد. گیاهان، از جمله منابعی هستند که مواد ضد میکروبی متنوعی تولید می‌کنند و دارای اثر سمی کم یا فاقد اثر سمی هستند [۱۶، ۱۸].

در مطالعه حاضر، اثر مهاری عصاره‌های اتانولی و متانولی چهار گیاه مریم گلی، سدر، اسفند و بلوط بر تشکیل بیوفیلیم توسط استافیلوکوکوس اورئوس ارزیابی شد. هابی و همکاران اثر عصاره‌های برگ، ساقه و میوه گیاه Quercus Cerris را بر رشد و تشکیل بیوفیلیم باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بررسی کردند. عصاره‌گیری با استفاده از چهار حلال اتانول، بوتانول، هگزان و اتیل استات انجام شد. نتایج نشان داد که عصاره بوتانولی ساقه، برگ و میوه بیشترین اثر را بر مهار بیوفیلیم این باکتری داشته است.

اولین مطالعه روی اثر ضد بیوفیلمی گیاه بلوط در سال ۲۰۱۷ توسط بهار و همکاران صورت گرفت. آن‌ها از عصاره آبی میوه بلوط استفاده کرده و اثر آن را بر تشکیل بیوفیلم توسط چهار باکتری شامل *پسودوموناس آئروژینوزا*، *اشرشیا کلی*، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* بررسی کردند. عصاره در غلظت ۱/۲ میلی گرم بر میلی لیتر استفاده شد و بیشترین اثر مهاری آن ۶۱ درصد روی *استافیلوکوکوس اورئوس* بود. در این مطالعه، غلظت‌های بیشتر عصاره استفاده نشده است [۲۷]. این مطالعه اولین گزارش اثر ضد بیوفیلمی عصاره دانه بلوط بر *استافیلوکوکوس اورئوس* است و عصاره اتانولی آن تأثیر ضد بیوفیلمی بیشتری نسبت به عصاره متانولی روی این باکتری نشان داد.

نتیجه‌گیری

با توجه به قدرت مهار تشکیل بیوفیلم *استافیلوکوکوس اورئوس* توسط گیاهان مورد بررسی، پیشنهاد می‌شود اجزای ضد میکروبی فعال موجود در این عصاره‌ها شناسایی و تخلیص شوند. همچنین اثر آنها در شرایط محیط زنده نیز ارزیابی شود تا بتوان به عنوان یک ترکیب طبیعی و فاقد عوارض جانبی از آنها در تهیه ترکیبات مهارکننده بیوفیلم و درمان عفونت‌های ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* استفاده کرد.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

اصول اخلاق پژوهش در مطالعه حاضر انجام شده است. این پژوهش توسط معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه شهید چمران اهواز با شماره SCU.SB99.673 تأیید شده است.

حامی مالی

این پژوهش توسط معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه شهید چمران اهواز حمایت شده است.

مشارکت‌نویسندگان

تمام نویسندگان در طراحی، اجرا و نگارش همه بخش پژوهش حاضر مشارکت داشته‌اند.

تعارض منافع

تضاد منافی بین پژوهشگران در این طرح پژوهشی وجود ندارد.

تشکر و قدردانی

از معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه شهید چمران اهواز تشکر و قدردانی می‌شود.

توسط *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان دادند. موارد تفاوت در قدرت اثر عصاره‌ها هنگام مقایسه مطالعه حاضر با مطالعه شجاعی مقدم و همکاران می‌تواند به دلیل تفاوت روش مورد استفاده در دو مطالعه باشد. به طور کلی روش‌های تعیین اثر ضد میکروبی در محیط‌های مایع، نتایج دقیق‌تری نسبت به روش‌های انجام‌شده در سطوح جامد در اختیار پژوهشگران قرار می‌دهند [۲۲].

اثر ضد بیوفیلمی عصاره‌های گیاهی مورد استفاده در این تحقیق، به طور جداگانه در برخی مطالعات دیگر نیز بررسی شده‌اند. صوفی و همکاران اثر ضد بیوفیلمی عصاره آبی چند گیاه دارویی، از جمله برگ سدر را در برابر باکتری‌های مقاوم به چند دارو از نمونه‌های بالینی ارزیابی کردند. باکتری‌های مورد مطالعه شامل *کلبسیلا پنومونیا*، *اشرشیا کلی*، *پسودوموناس آئروژینوزا* و *استافیلوکوکوس اورئوس* بودند.

از تمام گیاهان آزمایش‌شده، عصاره برگ سدر اثر بیشتری در برابر تمام سویه‌های مورد آزمایش نشان داد که با نتایج مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد. این عصاره حتی با غلظت ۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر بر برخی سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* اثر ممانعت از تشکیل بیوفیلم نشان داد [۲۳]. موارد تفاوت در غلظت مؤثر می‌تواند به دلیل اختلاف‌های ژنتیکی سویه مورد بررسی در مطالعه فوق و مطالعه حاضر و تفاوت در روش عصاره‌گیری از گیاه باشد.

محسنی‌پور و حسن شاهیان، فعالیت ضد بیوفیلمی عصاره‌های اتانولی و متانولی دانه و ساقه اسفند را بر شش باکتری شامل *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس*، *استرپتوکوک پنومونیا*، *پسودوموناس آئروژینوزا*، *اشرشیا کلی* و *کلبسیلا پنومونیا* بررسی کردند. بیشترین غلظت مورد استفاده بیست میلی گرم بر میلی لیتر بود که هر دو عصاره در این غلظت تشکیل بیوفیلم توسط *پسودوموناس آئروژینوزا* را مهار نکردند، اما تا ۹۰ درصد تولید بیوفیلم توسط سایر باکتری‌ها را متوقف کردند [۲۴].

در مطالعه حاضر، با استفاده از غلظت‌های بالاتر عصاره دانه اسفند توانستیم تشکیل بیوفیلم توسط *استافیلوکوکوس اورئوس* را به طور کامل مهار کنیم. ایزدی و میرازی اثر ضدباکتریایی اسانس اندام‌های هوایی گیاه مریم گلی را بر چهار باکتری گرم مثبت و گرم منفی با روش انتشار از دیسک ارزیابی کردند. غلظت سیصد میلی گرم بر میلی لیتر اسانس بیشترین اثر را روی *استافیلوکوکوس اورئوس* و کمترین اثر را روی *پسودوموناس آئروژینوزا* نشان داد [۲۵].

مهندس و همکاران، فعالیت ضد بیوفیلمی عصاره دی کلرومتان برگ مریم گلی را در برابر باکتری‌های پاتوژن پریودنتال بررسی کردند. این عصاره در برابر بیشتر باکتری‌های آزمایش‌شده فعالیت متوسطی نشان داد و تشکیل بیوفیلم توسط *پورفیروموناس جینجیوالیس* را مهار نکرد. در این مطالعه اثر ضد بیوفیلمی عصاره علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* بررسی نشده است [۲۶].

References

- [1] Klink B. Alternative medicines: Is natural really better. *Drug Top.* 1997; 141(2):99-100.
- [2] Altemimi A, Lakhssassi N, Baharlouei A, Watson D, Lightfoot D. Phytochemicals: Extraction, isolation, and identification of bioactive compounds from plant extracts. *Plants.* 2017; 6(4):42. [DOI:10.3390/plants6040042] [PMID] [PMCID]
- [3] Torabzadeh Khorasani P, Panahi P, Sabokbar A, Mokhtari A. [Antibacterial activity evaluation of Ephedra Major Host acetonic, aqueous and alcoholic extracts against standard strains of *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* and *S. pyogenes* (Persian)]. *J Comp Pathobiol.* 2009; 6(4):91-8. https://jcp.srbiau.ac.ir/article_5336.html
- [4] Sivadon P, Barnier C, Urios L, Grimaud R. Biofilm formation as a microbial strategy to assimilate particulate substrates. *Environ Microbiol Rep.* 2019; 11(6):749-64. [DOI:10.1111/1758-2229.12785] [PMID]
- [5] Archer NK, Mazaitis MJ, Costerton JW, Leid JG, Powers ME, Shirtliff ME. *Staphylococcus aureus* biofilms: Properties, regulation, and roles in human disease. *Virulence.* 2011; 2(5):445-59. [DOI:10.4161/viru.2.5.17724] [PMID] [PMCID]
- [6] Mahdavi M, Kasra Kermanshahi R, Jalali M. [The assessment of disinfectants on various bacterial biofilms (Persian)]. *Res J Univ Isfahan Sci.* 2008; 31(2):35-46. <https://www.sid.ir/fa/journal/ViewPaper.aspx?ID=109306>
- [7] Poulsen LV. Microbial biofilm in food processing. *LWT-Food Sci Technol.* 1999; 32(6):321-6. [DOI:10.1006/food.1999.0561]
- [8] Shopsin B, Kreiswirth BN. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerg Infect Dis.* 2001; 7(2):323-6. [DOI:10.3201/eid0702.010236] [PMID] [PMCID]
- [9] Gladstar R. Rosemary gladstar's medicinal herbs: A beginner's guide: 33 healing herbs to know, grow, and use. North Adams, MA: Storey Publishing, LLC; 2012. https://books.google.com/books/about/Rosemary_Gladstar_s_Medicinal_Herbs_A_Be.html?id=Aa7isKZDmAYC&source=kp_book_description
- [10] Panahi P, Jamzad Z, Pourmajidian M, Fallah A, Pourhashemi M, Sohrabi H. Taxonomic revision of the *Quercus brantii* complex (Fagaceae) in Iran with emphasis on leaf and pollen micromorphology. *Acta Bot Hung.* 2012; 54(3-4):355-75. [DOI:10.1556/ABot.54.2012.3-4.13]
- [11] Cunningham S. Cunningham's encyclopedia of magical herbs. Woodbury: Llewellyn Worldwide; 1985. https://books.google.com/books/about/Cunningham_s_Encyclopedia_of_Magical_Her.html?id=jqmStQEACAAJ
- [12] Nejad MS, Niroomand A. Carbohydrate content and its roles in alternate bearing in olive. *Pak J Biol Sci.* 2007; 10(16):2744-7. [DOI:10.3923/pjbs.2007.2744.2747] [PMID]
- [13] Seyyednejad SM, Koochak H, Darabpour E, Motamedi H. A survey on *Hibiscus rosa-sinensis*, *Alcea rosea* L. and *Malva neglecta* Wallr as antibacterial agents. *Asian Pac J Trop Dis.* 2010; 3(5):351-5. [DOI:10.1016/S1995-7645(10)60085-5]
- [14] Fonseca AP, Extremina C, Fonseca AF, Sousa JC. Effect of subinhibitory concentration of piperacillin/tazobactam on *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol.* 2004; 53(9):903-10. [DOI:10.1099/jmm.0.45637-0] [PMID]
- [15] Arciola CR, Campoccia D, Montanaro L. Implant infections: Adhesion, biofilm formation and immune evasion. *Nat Rev Microbiol.* 2018; 16(7):397-409. [DOI:10.1038/s41579-018-0019-y] [PMID]
- [16] Costerton JW, Montanaro L, Arciola CR. Biofilm in implant infections: Its production and regulation. *Int J Artif Organs.* 2005; 28(11):1062-8. [DOI:10.1177/039139880502801103] [PMID]
- [17] Tande AJ, Patel R. Prosthetic joint infection. *Clin Microbiol Rev.* 2014; 27(2):302-45. [DOI:10.1128/CMR.00111-13] [PMID] [PMCID]
- [18] Ebani VV. Biology and pathogenesis of *Staphylococcus* infection. *Microorganisms.* 2020; 8(3):383. [DOI:10.3390/microorganisms8030383] [PMID] [PMCID]
- [19] Hoekstra J, Rutten VP, Lam TJ, Van Kessel KP, Spaninks MP, Stegeman JA, et al. Activation of a bovine mammary epithelial cell Line by ruminant-associated *Staphylococcus aureus* is lineage dependent. *Microorganisms.* 2019; 7(12):688. [DOI:10.3390/microorganisms7120688] [PMID] [PMCID]
- [20] Hobby GH, Quave CL, Nelson K, Compadre CM, Beenken KE, Smeltzer MS. *Quercus cerris* extracts limit *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *J Ethnopharmacol.* 2012; 144(3):812-5. [DOI:10.1016/j.jep.2012.10.042] [PMID] [PMCID]
- [21] Shojaei Moghadam S, Maleki S, Darabpour E, Motamedi H, Nejad SM. Antibacterial activity of eight Iranian plant extracts against methicillin and cefixime resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Asian Pac J Trop Med.* 2010; 3(4):262-5. [DOI:10.1016/S1995-7645(10)60063-6]
- [22] AL-Saadi ZN. Estimation of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of cell-free extracts of *Bifidobacterium* species against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in vitro. *Am J Biomed Life Sci.* 2016; 4(5):75-80. [DOI:10.11648/j.ajbls.20160405.12]
- [23] Sofy AR, Aboseidah AA, El-Morsi ES, Azmy HA, Hmed AA. Evaluation of antibacterial and antibiofilm activity of new antimicrobials as an urgent need to counteract stubborn multidrug-resistant bacteria. *J Pure Appl Microbiol.* 2020; 14(1):595-608. [DOI:10.22207/JPAM.14.1.62]
- [24] Mohsenipour Z, Hassanshahian M. Antibacterial activity of *euphorbia hebecarpa* alcoholic extracts against six human pathogenic bacteria in planktonic and biofilm forms. *Jundishapur J Microbiol.* 2016; 9(6):e34701. [DOI:10.5812/jjm.34701] [PMID] [PMCID]
- [25] Izadi Z, Mirazi N. [Identification of chemical compounds and evaluation of antioxidant and antimicrobial properties of sage (*Salvia officinalis* L.) essential oil at different harvest times (Persian)]. *Qom Univ Med Sci J.* 2020; 14(9):1-15. [DOI:10.52547/qums.14.9.1]
- [26] Mendes FS, Garcia LM, da Silva Moraes T, Casemiro LA, de Alcântara CB, Ambrósio SR, et al. Antibacterial activity of *salvia officinalis* L. against periodontopathogens: An in vitro study. *Anaerobe.* 2020; 63:102194. [DOI:10.1016/j.anaerobe.2020.102194] [PMID]
- [27] Bahar Z, Ghotaslou R, Taheri Sh. In vitro anti-biofilm activity of *Quercus brantii* subsp. *persica* on human pathogenic bacteria. *Res J Pharmacogn.* 2017; 4(1):67-73. http://www.rjpharmacognosy.ir/article_41185_0.html