ارزیابی اثرات عصاره چهار گیاه دارویی بر حذف پلاسمید، تغییر شکل و محتوای دیواره سلولی چندین سوش از باکتری کلبسیلا پنومونیه

مصطفی محمدی[۱]*، حمیدرضا عکافی[۲]، شورا یزدان‌شناس[۳]، محمد ادیب‌نژاد[٤]

۱- مربی، عضو هیأت علمی، دانشجوی دکترای ژنتیک مولکولی، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، اصفهان

۲- مربی، عضو هیأت علمی، دانشجوی دکترای اکولوژی گیاهی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، اصفهان

۳- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران

٤- دانشیار، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، اصفهان

*آدرس مکاتبه: اصفهان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، دانشکده علوم زیستی، گروه بیوشیمی

تلفن و نمابر: ۷٤۲۰۱٤٥ (۰۳۱۱)

پست الکترونیک: mohamadi@iaufala.ac.ir

تاریخ دریافت: ۸۹/۱۲/۱ **تاریخ تصویب:** ۹۰/۱۰/٦

چکیده

مقدمه: مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها یک مشکل رو به گسترش است. بااستفاده نامناسب از آنتی‌بیوتیک‌ها گونه‌هایی از باکتری‌ها به داروهای ضدمیکروبی مقاوم می‌شوند و سیر درمان را مشکل می‌کنند. گیاهان دارویی و مشتقات حاصل از آنها منبع خوبی برای درمان بوده و اثرات موثری علیه حذف مقاومت دارویی دارند.

هدف: بررسی اثر ضدمیکروبی، ضدپلاسمیدی و نحوه عملکرد عصاره‌های چهار گیاه دارویی بر روی سوش‌های حاوی پلاسمید باکتری کلبسیلا پنومونی مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف.

روش بررسی: باکتری‌های کلبسیلا پنومونیه از نمونه‌های بیمارستانی خالص‌سازی شده تست آنتی‌بیوگرام شده و عصاره‌های آبی و الکلی گیاهان مورد بررسی، استخراج شد. مطالعه کمترین غلظت باز دارنده از رشد(**MIC**) عصاره‌های استخراج شده نسبت به سوش‌های مقاوم کلبسیلا پنومونی انجام گرفت. بیشترین غلظت عصاره که باکتری در آن رشد می‌کرد (**SIC**) برای انجام آزمایش حذف پلاسمید استفاده شد. آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده عبارت بودند از: آموکسی‌سیلین (**Amox**)، آمپی‌سیلین (**AP**)، سفتی زوکسیم (**CAZ**)، سفوتاکسیم (**CTX**) و وانکومایسین (**V**). پس از در معرض قرار دادن باکتری‌ها با عصاره‌های موردنظر، مورفولوژی آنها بررسی شد و سپس بر روی سوش‌های حاوی پلاسمید اثر حذف انتخابی پلاسمیدها بررسی شد.

نتایج: مطالعه کمترین غلظت بازدارنده از رشد (**MIC**) عصاره‌های استخراج شده نشان داد که تمامی عصاره‌ها خاصیت ضدمیکروبی داشته و قادر بودند از رشد سوش‌های مقاوم کلبسیلا پنومونیه جلوگیری کنند. بیشترین خاصیت ضدمیکروبی این عصارها مربوط به عصاره‌های آویشن و پرسیاوش بود. بررسی حساسیت دارویی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های ذکر شده در سوش‌هایی که در معرض رقت‌های مختلف **SIC** قرار گرفته بودند و مقایسه آن با سوش‌هایی که در معرض عصاره قرار نگرفتند، نشان داد که تغییر زیادی در **MIC** و کاهش مقاومت دارویی ایجاد نمی‌شود. بررسی مورفولوژی باکتری‌هایی که در معرض عصاره قرار گرفته‌اند، نشان داد که وقتی سوش‌های کلبسیلا در معرض عصاره‌های آویشن و پرسیاوش قرار می‌گیرند،کوچکتر شده و کپسول باکتری از بین می‌رود. علاوه برتغییر شکل باکتری، خصوصیت رنگ‌پذیری این باکتری نیز تغییر پیدا می‌کند. این نتیجه نشان دهنده اثر موتاژنیک قوی این عصاره‌ها می‌باشد و اینکه این عصاره‌ها روی ژن یا بیان ژن تولید کننده کپسول اثر می‌گذارد. مطالعه سوش‌های دارای پلاسمید به کمک آگارز ژل الکتروفورز نشان داد که حذف انتخابی پلاسمیدها در باکتری‌ها انجام نشده است.

نتیجه‌گیری: از بررسی نتایج بالا چنین استنباط می‌شود که عصاره‌های گیاهان دارویی مورد آزمایش هیچ‌گونه اثر ضدپلاسمیدی نداشته هر چند که اثر ضدباکتریایی عصاره‌های پرسیاوش و آویشن بسیار مورد توجه است.

گل‌واژگان: حذف پلاسمید، مقاومت دارویی، گیاهان دارویی

www.SID.ir

مقدمه

مقاومت دارویی یک مشکل رو به گسترش سیستم سلامت در سطح دنیا است که در اثر استفاده نامناسب از آنتی‌بیوتیک‌ها، تغییرات کروموزومی و تبادلات ژنتیکی از طریق پلاسمید یا ترانسپوزون‌ها رخ می‌دهد و طی آن گونه‌هایی از باکتری‌ها به داروهای ضدمیکروبی مقاوم می‌شوند و سیر درمان بیماری را مشکل می‌کنند [٦ - ١]. ترکیباتی که در همانندسازی DNA دخالت می‌کنند، می‌توانند در حذف پلاسمید و از بین بردن مقاومت دارویی مؤثر باشند. از این ترکیبات می‌توان به آکریدین، اتیدیوم بروماید و سدیم دودسیل سولفات اشاره کرد [٢،٣،٧،٨]. مطالعات نشان داده که این ترکیبات سمی بوده و یا موتاژن هستند و ضرورت استفاده از عوامل با ضریب تأثیر بالا و خطرات کمتر را پیشنهاد داده‌اند [٢]. از آنجایی که گیاهان دارویی و مشتقات حاصل از آنها همیشه منبع خوبی برای درمان بوده و اثرات مؤثری علیه حذف مقاومت دارویی داشته‌اند، لذا این مطالعه به منظور بررسی و ارزیابی اثرات ضدپلاسمیدی عصاره‌های چهار گیاه دارویی انجام گرفت. گیاهان دارویی پرسیاوشان (*Adianthum capillus-veneris*)، آویشن کرمانی (*Thymus caramanicus*)، بنفشه سه رنگ (*Viola tricolor*) و بادرنجبویه (*Dracocephalum polychaetum*) که در طب سنتی جهت درمان بیماری‌های مجاری تنفسی و به عنوان عوامل ضدعفونی کننده استفاده می‌شدند، انتخاب و بر روی سوش‌های باکتری کلبسیلا پنومونیه مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها اثر داده شد. عصاره این چهار گیاه دارویی به روش خیساندن (Maceration) و همچنین روش الکلی تهیه و به منظور بررسی اثر ضدباکتریایی آنها و نیز بررسی جایگاه احتمالی آنها در حذف پلاسمیدهای مسبب مقاومت آنتی‌بیوتیکی، مورد مصرف قرار گرفت. گیاهان بررسی شده چنان‌که در داخل بدن قادر به مهار فعالیت و یا تخریب باکتری‌های بیماری‌زا باشند باید بتوانند در محیط خارج سلولی هم این خاصیت را نشان دهند. حال چنانچه عصاره گیاهان بر رشد و فعالیت باکتری‌های بیماری‌زا مؤثر باشد با تعیین نحوه تأثیر و جایگاه مولکولی آن می‌توان داروهای نسل جدیدی را تولید کرد که با هزینه و اثرات جانبی کم، درمان به نحو مؤثرتر روی دهد. مطالعات زیادی درباره خاصیت ضدمیکروبی و ضدباکتریایی گیاهان دارویی و الگوهای مقاومت دارویی انجام شده است. در سال ١٣٨٤ الگوی مقاومت دارویی و محتوی پلاسمیدی جدایه‌های *E. coli* از موارد کلی باسیلوز طیور توسط حقیقی و پیغمبری بررسی شد [٩]. شکیبایی و همکاران در سال ١٣٧٩ اثرات ضدپلاسمیدی و ضدمیکروبی عصاره پنج گیاه دارویی منطقه کرمان را مورد مطالعه قرار دادند [١٠]. عادل کمال اثر دو گیاه سیر و مورد را بر روی حذف مقاومت آنتی‌بیوتیکی و تجمع باکتری پروتئوس در سال ٢٠٠٨ مطالعه نمود [٣]. وارشا شریرام در سال ٢٠١٠ طی مطالعه‌ای به بررسی فعالیت ضدباکتریایی و ضدپلاسمیدی گیاه *Helicteres isora* L. پرداخت [٢]. گابریلا اسپنگلر در سال ٢٠٠٦ در قالب پایان‌نامه دکتری خود به تلاش‌هایی برای کاهش مقاومت دارویی باکتری‌ها و سلول‌های سرطانی اشاره کرده است [١١]. ابو زید در سال ٢٠١٠ در مقاله خود اشاره به کنترل باکتری‌های چند مقاومتی آلوده‌کننده سیستم تنفسی از طریق استفاده از عصاره و روغن‌های فرار گیاهی کرده است [٤]. ایوان و همکاران در سال ٢٠٠٠ گزارش کردند که توانسته‌اند پلاسمید بسیار بزرگ ١٣٦٠ کیلو بازی pRme2011 موجود در *Sinorhizobium meliloti* را با استفاده از ترانسپوزون Tn5B12-S که ژن sacB در آن قرار داده شده بود، از بین ببرند [١٢]. جهت حذف پلاسمید و مقاومت دارویی باکتری‌ها، آناماریا مولنار در سال ٢٠٠٦ از گروهی از ترکیبات مختلف از جمله فنوتیازین و بنزوگزازول استفاده نمود [١٣]. زمانی در سال ٢٠٠٧ برای مطالعات ضدباکتریایی در سویه‌های *E. coli*، فلزات سنگین، آنتی‌بیوتیک و اشعه UV را به کار گرفت [١٤]. شلز تأثیر روغن‌های فرار گیاهان را بر حذف پلاسمید باکتری *E. coli* در سال ٢٠٠٦ مطالعه نمود [١٥]. مولنار در سال ٢٠٠٣ اثرات ضدپلاسمیدی پرومتازین را در کشت مخلوط باکتری‌ها مطالعه نمود [١٦].

Archive of SID
www.SID.ir

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و عصاره‌گیری از گیاهان دارویی

دو گیاه دارویی آویشن کرمانی (*Thymus caramanicus*) و بادرنجبویه (*Dracocephalum polychaetum*) از کوه‌های اطراف کرمان و گیاه پرسیاوشان (*Adianthum capillus-veneris*) از منطقه سمیرم اصفهان جمع‌آوری شد. گیاه بنفشه سه رنگ (*Viola tricolor*) نیز از گلخانه تهیه شد. پس از شناسایی و تأیید گیاهان توسط متخصص مربوطه، نمونه‌ای از گیاهان مذکور با کدهای هرباریومی ۱۱٤،۰۰۸،۰۰۱ (آویشن)، ۱۱٤،۰۱۹،۰۰۱ (بادرنجبویه)، ۰۰۳/۰۰۱،۰۰۱،٦ (پرسیاوشان) و ۰٤۸،۰۰۱،۰۰۱ (بنفشه) در هرباریوم دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان نگهداری شد. در ادامه، ۵ گرم از هر گیاه خشک را در هاون دستی آسیاب نموده و پودر حاصل را در داخل لوله‌های شیشه‌ای دربدار ریخته و محتویات هر لوله به مدت ۷ – ۵ روز در ۱۵ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد خیسانده شد. با این هدف که عصاره گیاهی به نحو مطلوبی وارد فاز الکلی شود، لوله‌ها به طور یک روز در میان توسط همزن برقی به مدت ۱ دقیقه کاملاً مخلوط شد. پس از گذشت زمان لازم، مقدار ۳ – ۲ میلی‌لیتر از محلول شفاف رویی را برداشته و درون لوله‌هایی به قطر ۳ سانتی‌متر وارد نموده و پس از نصب کد شناسایی، توسط دستگاه تقطیر در خلا در درجه حرارات ٤۵ – ٤۰ درجه سانتی‌گراد تغلیظ شد. به منظور خشک شدن کامل محلول، نمونه به مدت ۲٤ ساعت در دسیکاتور متصل به پمپ خلا قرار گرفت. عصاره خشک شده تا زمان انجام مراحل بعدی در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

تهیه باکتری و تعیین حساسیت دارویی

هفت سوش مقاوم کلبسیلا پنومونیه از آزمایشگاه‌های شهر اصفهان (بیمارستانی و غیربیمارستانی) ایزوله شد. هر مورد پس از شناسایی، خالص‌سازی شده و مورد بررسی باکتریولوژیک قرار گرفت. بررسی وجود پلاسمید و مشاهده آن با استفاده از روش بررسی الکتروفورزی انجام شد. از ۷ سوش ایزوله شده، ۵ سوش دارای پلاسمید بودند که این گروه جهت تست حذف پلاسمید استفاده شدند.

بررسی اثر ضدمیکروبی عصاره‌های گیاهی

برای تعیین حداقل غلظت بازدارنده از رشد باکتری‌های بیماری‌زا (MIC) از روش تهیه رقت استفاده شد [۱۰]. عصاره‌های غلیظ آبی یا الکلی استخراج شده از گیاهان دارویی بالا، به نحوی رقیق شدند که پس از افزایش یک میلی‌لیتر سوسپانسیون میکروبی دارای ۲×۱۰^{٦} در میلی‌لیتر به هر یک از لوله‌ها، رقت‌های ۰/۵، ۰/۲۵، ۰/۱۲۸، ۰/۰٦٤، ۰/۰۳۲، ۰/۰۱٦ تا ۰/۰۰۱، میلی‌گرم در میلی‌لیتر به دست آمد. محیط‌های تلقیح شده مذکور به مدت ۲٤ ساعت در حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از طی این دوره، حداقل غلظتی که در حضور آن رشدی صورت نگرفته بود به عنوان حداقل غلظت مانع رشد (MIC) عصاره انتخاب شد. همچنین حداقل غلظتی از ماده ضدمیکروبی که موجب ۹۹/۹ درصد کاهش در تعداد باکتری‌های مایه اصلی می‌شود به عنوان حداقل غلظت کشنده باکتری (MBC) انتخاب شد.

بررسی حذف پلاسمید

برای بررسی حذف پلاسمید، از باکتری‌های رشد یافته در غلظت SIC استفاده شد. بدین‌صورت که باکتری‌های رشد یافته در غلظت SIC عصاره را جدا نموده و به صورت سریال (۲–۱۰، ٤–۱۰، ٦–۱۰، ۸–۱۰) رقیق می‌کنیم. سپس حدود ۱۰۰ کلنی جدا را با کمک کبریت استریل بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت می‌دهیم. همزمان چهار کلنی کنترل (بدون در معرض قرار دادن با عصاره) استفاده می‌شود.

بررسی مورفولوژی باکتری‌های در معرض عصاره قرار گرفته از طریق میکروسکوپ

با استفاده از میکروسکوپ نوری Nikon و نیز میکروسکوپ فلورسانت (Nikon Optiphot–2) و نیز

Archive of SID
www.SID.ir

روش‌های رنگ‌آمیزی گرام، کپسول باکتری‌های قرار گرفته در معرض عصاره‌های مختلف از نظر تشکیل کپسول و نیز تغییر شکل مورد ارزیابی مورفولوژیکی قرار گرفتند [۱۰،۱۷].

استخراج پلاسمید به روش لیز آلکالینی با SDS

می‌توان DNA پلاسمیدی را از مقادیر کم کشت‌های باکتریایی با استفاده از SDS و مواد قلیایی جداسازی نمود. DNA استخراج شده با این روش جهت بررسی‌های الکتروفورزی و یا بررسی اثر آنزیم‌های محدود الاثر مناسب می‌باشد. همچنین می‌توان از آن در تعیین توالی DNA استفاده کرد. در این مرحله، باکتری‌هایی که در معرض عصاره قرار داده شده بودند را به کمک عوامل لیزکننده دیواره غشا سلولی (EDTA0.5 % ،۲٪ SDS) پاره نموده و پلاسمید جدا شد. ۶۰ میکرولیتر از محلول DNA پلاسمیدی خالص پس از آغشتن با آنزیم RNase در چاهک‌هایی در آگارز ژل ۰/۷ درصد ریخته شد و الکتروفورز با ۳۰ میلی‌آمپر به مدت ۳ ساعت انجام شد. وجود و عدم وجود پلاسمید در این سوش‌ها با سوش‌های وحشی که در معرض عصاره قرار نگرفته‌اند مقایسه شد [۱۸،۱۹].

بررسی وجود پلاسمید و آگارز ژل الکتروفورز

در این مرحله باکتری‌های قرار گرفته در معرض عصاره‌های مختلف را به کمک عوامل لیزکننده دیواره غشاء سلولی که شامل SDS ۲ درصد و EDTA ۰/۵درصد می‌باشد پاره نموده و پلاسمیدها را جدا می‌کنیم. وجود پلاسمید در این سوش‌ها و سوش‌های اولیه (وحشی) به عنوان کنترل مثبت مقایسه شد [۱۸،۱۹،۲۰].

نتایج

بررسی حساسیت سوش‌های ایزوله شده نسبت به عصاره‌ها

جدول شماره ۱ حساسیت سوش‌های کلبسیلا پنومونیه ایزوله شده را نسبت به چهار عصاره گیاهان دارویی بنفشه، پرسیاوشان، بادرنجبویه و آویشن نشان می‌دهد.

جدول شماره ۱ - بررسی حساسیت سوش‌های ایزوله شده نسبت به عصاره‌های گیاهی

عصاره / سوش کلبسیلا / آزمایش‌ها	K1	K2	K3	K4	K5
بنفشه MIC	۰/۵	۰/۵	۰/۰۶	۰/۲۵	۰/۲۵
بنفشه MBC	رقیق نشده	۰/۵	۰/۰۶	رقیق نشده	۰/۵
بنفشه SIC	۰/۱	۰/۱	۰/۱	۰/۱	۰/۱
پرسیاوشان MIC	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۵	۰/۵
پرسیاوشان MBC	۰/۵	۰/۵	۰/۲۵	۰/۲۵>	۰/۵
پرسیاوشان SIC	۰/۱	۰/۱	۰/۱	۰/۲۵	۰/۱
بادرنجبویه MIC	۰/۲۵	۰/۵	۰/۲۵	۰/۵>	۰/۵>
بادرنجبویه MBC	۰/۲۵	۰/۵	۰/۵	رقیق نشده	۰/۵>
بادرنجبویه SIC	۰/۱	۰/۲۵	۰/۱	۰/۵	۰/۲۵
آویشن MIC	۰/۰۶	۰/۲۵	۰/۰۵	۰/۵	۰/۲۵>
آویشن MBC	۰/۰۶	۰/۲۵	۰/۱	۰/۵	۰/۲۵>
آویشن SIC	۰/۰۳	۰/۱	۰/۰۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵

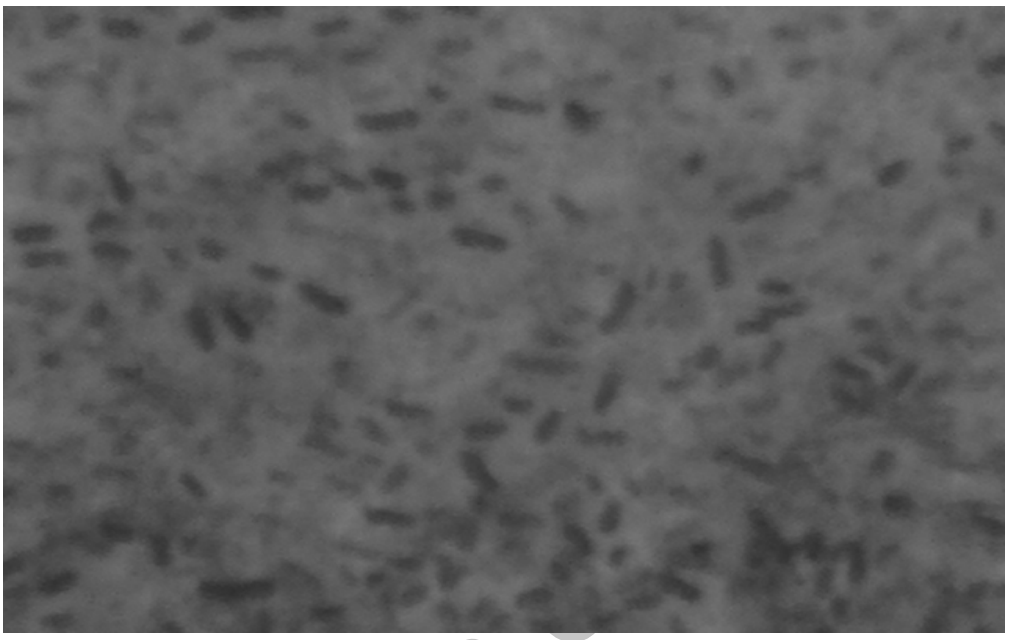
نتایج بالا معدل ۳ بار آزمایش است. کمترین غلظت ممانعت کننده از رشد = MIC حداقل غلظت باکتری‌کش عصاره = MBC

بیشترین غلظت عصاره که باکتری در آن رشد می‌کند = SIC سوش‌های کلبسیلا پنومونیه جدا شده از بیمارستان‌های اصفهان = K

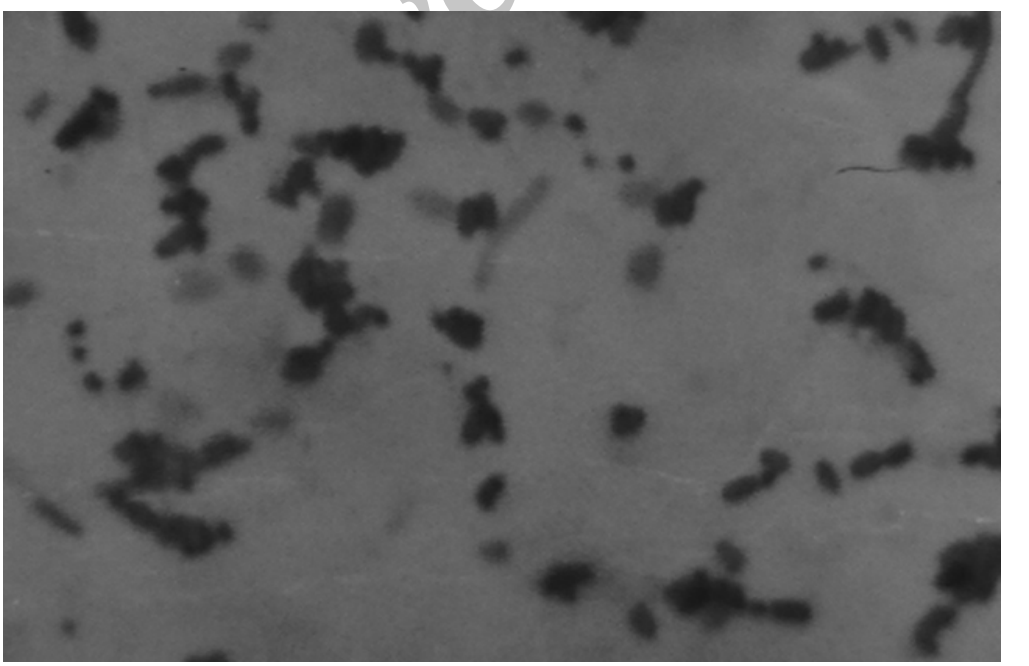
Archive of SID
www.SID.ir

بررسی مورفولوژی سلولی و وجود کپسول در سوش‌های در معرض عصاره قرار گرفته

تصویرهای زیر اثرات عصاره‌های آویشن و پرسیاوشان را بر شکل و کپسول باکتری کلبسیلا پنومونیه نشان می‌دهد.

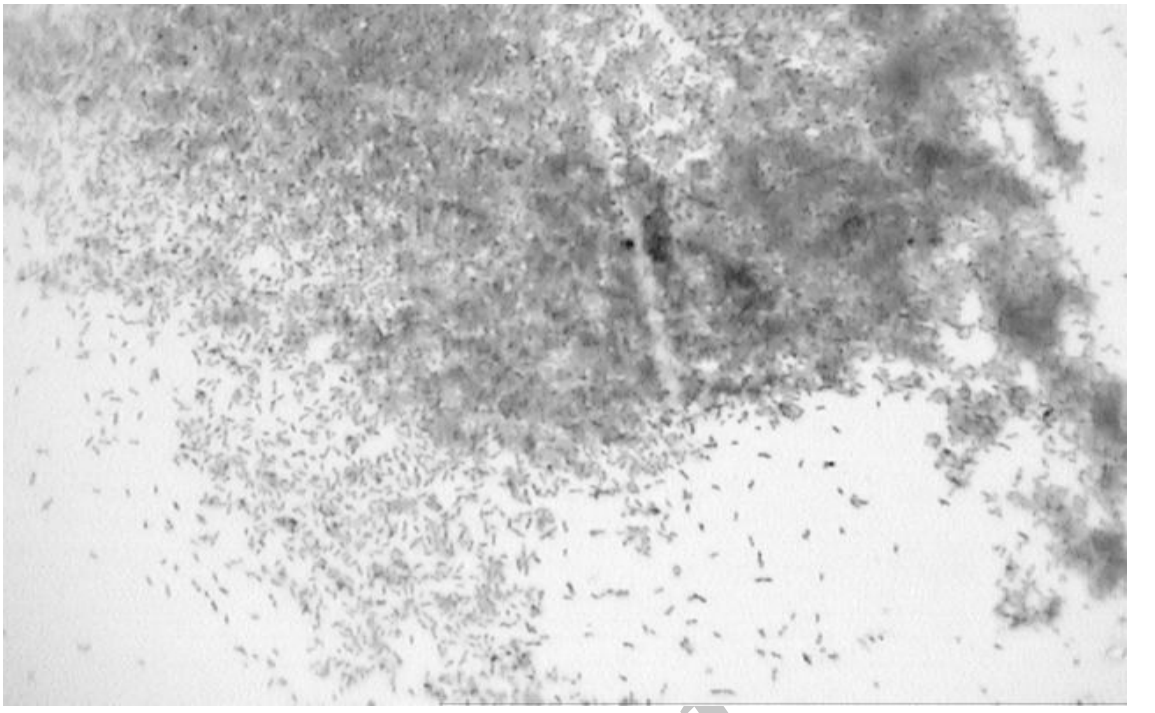


تصویر شماره ۱- رنگ‌آمیزی کپسول: شکل و کپسول باکتری قبل از قرار گرفتن در معرض عصاره آویشن (1000X)

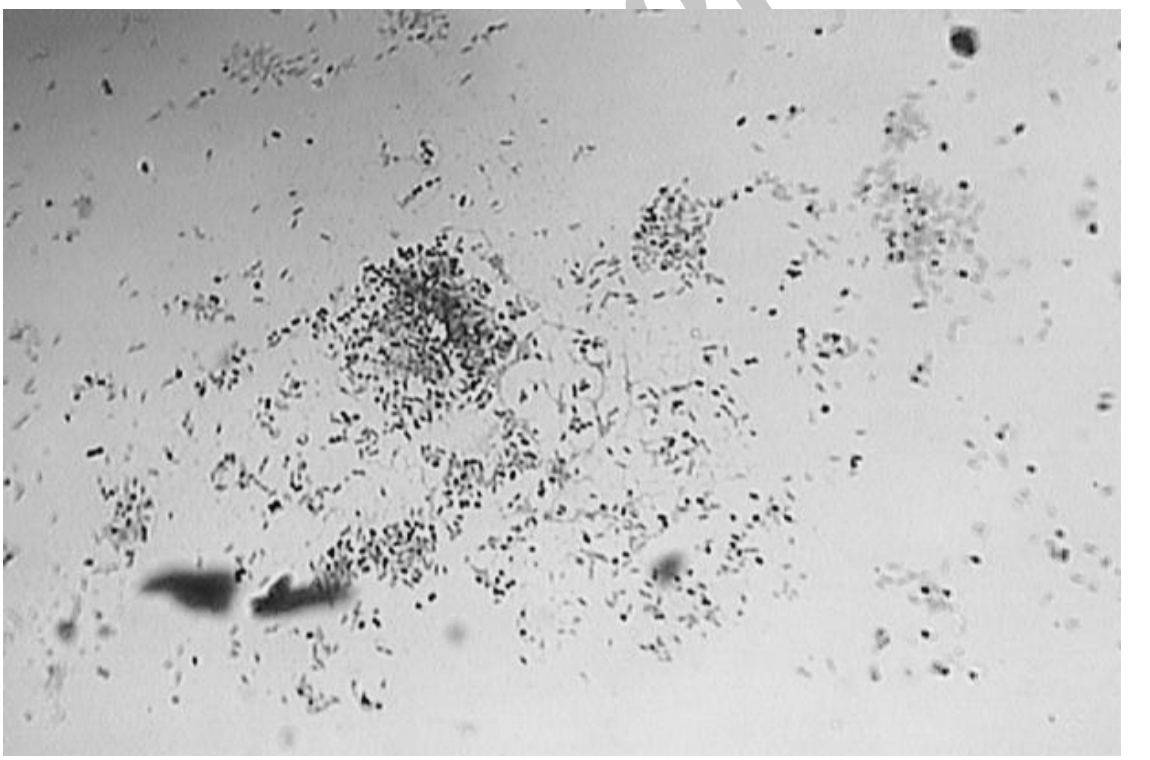


تصویر شماره ۲- رنگ‌آمیزی کپسول: شکل و کپسول باکتری بعد از قرار گرفتن در معرض عصاره آویشن (1000X)

www.SID.ir



تصویر شماره ۳- شکل باکتری کلبسیلا پنومونیه در حالت طبیعی (رنگ آمیزی گرام) (1000X).

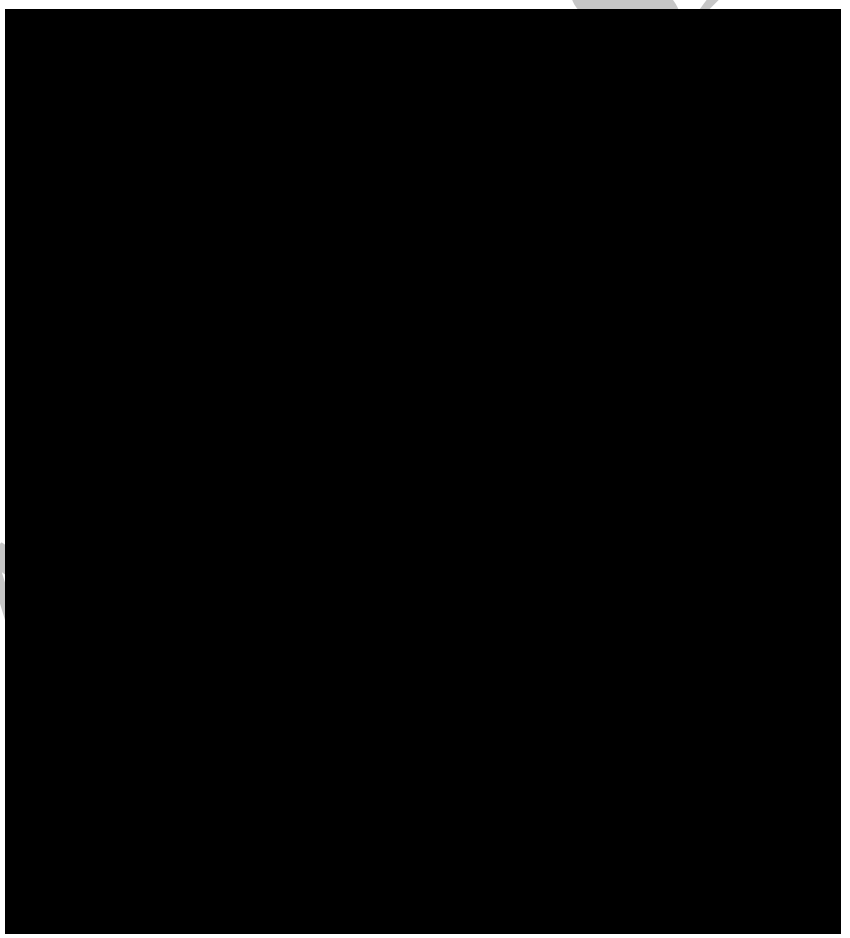


تصویر شماره ٤- شکل باکتری در حالت قرار گرفته در معرض عصاره پرسیاوشان (1000X)

www.SID.ir

تصویر شماره ۵- شکل باکتری در حالت قرار گرفته در معرض عصاره آویشن (1000X)

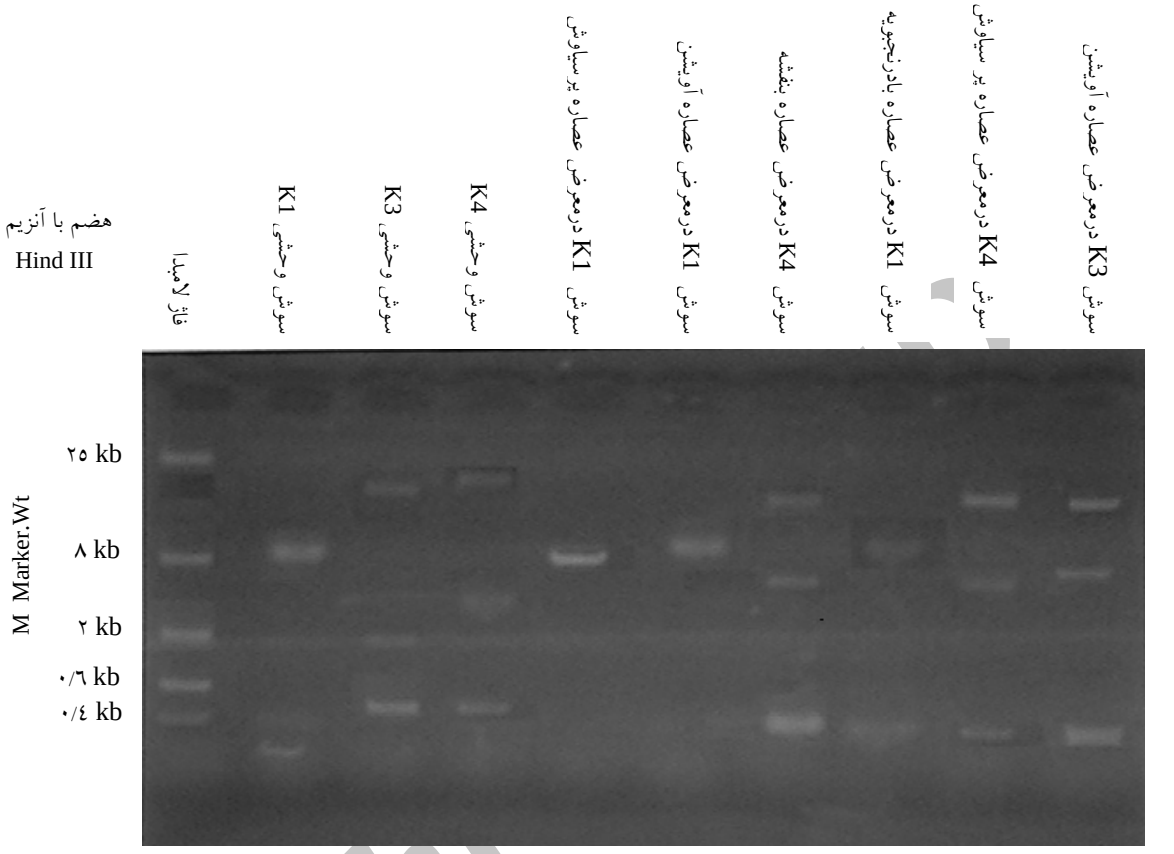
تعیین حساسیت (MIC) سوش‌های مقاوم کلبسیلا پنومونیه نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها پس از قرار گرفتن در معرض عصاره‌های گیاهی در نمودار شماره ۱ نشان داده شده است.



نمودار شماره ۱- تعیین حساسیت (MIC) سوش‌های مقاوم کلبسیلا پنومونیه نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها پس از قرار گرفتن در معرض عصاره‌های گیاهی

www.SID.ir

بررسی فیزیکی **DNA** پلاسمیدی سوش‌های کلبسیلا پنومونیه تیپ وحشی و قرار گرفته در معرض عصاره با استفاده از ژل الکتروفورز ۰/۷ درصد در تصویر شماره ٦ مشاهده می‌شود.



تصویر شماره ٦ – بررسی حذف پلاسمید از طریق ژل الکتروفورز

بحث

در مورد بررسی اثر ضدمیکروبی گیاهان دارویی، در کشور ما و در بسیاری از کشورهای جهان مطالعات زیاد و گسترده‌ای انجام گرفته است. در این پژوهش از ۵ سوش مقاوم کلبسیلا پنومونیه ایزوله شده از بیمارستان‌های شهر اصفهان برای بررسی اثر ضدباکتریایی و ضدپلاسمیدی چهار گیاه دارویی بادرنجبویه، آویشن، پر سیاوش و گل بنفشه استفاده شد. عصاره‌های آبی و متانولی همه گیاهان فوق فعالیت ضدباکتریایی از خود نشان دادند. در این میان عصاره آویشن دارای بیشترین خاصیت ضدمیکروبی در مقایسه با سایر عصاره‌ها بود. عصاره گیاه پر سیاوشان نیز از اثر ضدباکتریایی خوبی برخوردار بود. نتایج به دست آمده تأییدی بر گزارش‌های ارائه شده از اثرات ضدباکتریایی عصاره‌های گیاهی است. بهدانی و همکارانش در سال ۱۳۸۸ به بررسی فعالیت ضدباکتریایی حنا علیه باکتری‌های استافیلوکوکوس و سودوموناس پرداختند. یافته‌های آنها استفاده از حنا را در درمان عفونت‌های پوست و زخم پیشنهاد داده است [۲۱]. آکین و همکارانش در سال ۲۰۱۰ در مطالعه‌ای با عنوان اثرات ضدباکتریایی عصاره‌های برخی از گیاهان تیره نعناع، اعلام نمودند که استفاده از گیاهانی مثل: *Teucrium*، *Salvia* و

www.SID.ir

Thymbra در صنایع غذایی، پزشکی و داروسازی مفید است [۲۲]. فعالیت ضدمیکروبی برخی از گیاهان (*Alpinia, Tamarindus, Cynodon, Dipteris, …*) منطقه هند توسط موسومی و همکارش در سال ۲۰۱۰ انجام گرفت. آنها نشان دادند که عصاره استونی گیاه *Alpinia* فعالیت ضدمیکروبی بیشتری نسبت به بقیه گیاهان داشته است. همچنین، هر گیاهی روی باکتری خاصی بیشترین تأثیر را دارد [۲۳]. حذف DNA پلاسمیدی، عامل مقاومت دارویی در باکتری‌های پاتوژن، از اهمیت کلینیکی بالایی در درمان شیمیایی باکتری‌ها و ژنتیک میکروبی دارد. این حذف می‌تواند به شیوه‌های مختلف من جمله استفاده از عصاره‌های گیاهی انجام شود. متأسفانه در کشور ما تحقیقات در سطح وسیع، مبنی بر اینکه آیا عصاره‌های گیاهی توانایی از بین بردن مقاومت دارویی پلاسمیدی را دارند یا خیر، به نتیجه نرسیده است. در این تحقیق از ۵ سوش مقاوم کلبسیلا پنومونیه که دو تای آنها حاوی پلاسمید بودند برای بررسی اثر ضدپلاسمیدی عصاره چهار گیاه دارویی استفاده شد. بر اساس نتایج بالا مشخص می‌شود که عصاره‌های گیاهان دارویی آویشن، بادرنجبویه، بنفشه و پرسیاوشان هیچ‌گونه اثر ضدپلاسمیدی روی سوش‌های کلبسیلا پنومونیه حاوی پلاسمید نداشتند، اگر چه خاصیت ضدمیکروبی از خود بر جای می‌گذارند. شلز و همکارانش در سال ۲۰۰۶ فعالیت ضدمیکروبی و ضدپلاسمیدی روغن‌های فرار چندین گیاه از جمله: پرتقال، اکالیپتوس، شمعدانی، سرو، رزماری و فلفل را بررسی کردند. نتایج آنها نیز نشان داده که اگرچه عصاره همه گیاهان خاصیت ضدمیکروبی داشته ولی تنها سه گیاه، خاصیت ضدپلاسمیدی داشته است [۱۵]. مطالعه روی حذف پلاسمید در سوش‌های k1, k3, k4 نشان داد که کاهش کم MIC آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین، آموکسی‌سیلین، سفتی زوکسیم، سفوتاکسیم و وانکومایسین پس از در معرض قرار گرفتن باکتری‌ها با عصاره، به دلیل حذف پلاسمید در درون آنها نیست. نکته مهم، از دست دادن کپسول باکتری، کوتاه شدن طول آن و تغییراتی در خاصیت رنگ‌آمیزی باکتری پس از در معرض قرار گرفتن با عصاره آویشن و پرسیاوشان بود. هنگام الکتروفورز روی ۰/۷ درصد آگارز ژل، هیچ‌گونه حذف فیزیکی پلاسمید مشاهده نشد. شکیبایی و همکاران در سال ۲۰۰۰ نشان دادند که عصاره گیاه مورد، می‌تواند باعث تغییر کپسول باکتری کلبسیلا شده و در آن اختلال ایجاد کند [۱۰]. عادل کمال در سال ۲۰۰۸ تأثیر عصاره‌های گیاهان سیر و مورد را در حذف مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری پروتئوس بررسی کرد. وی بیان داشت که غالب ژن‌های ایجاد مقاومت دارویی در سویه‌های مختلف این باکتری، روی پلاسمید واقع است و نتایج نشان داده که عصاره سیر در حذف پلاسمید سویه P_{23} و عصاره مورد در حذف پلاسمید سویه P_7 بشتر مؤثر بوده است [۳]. وارشا نیز فعالیت ضدباکتریایی و ضدپلاسمیدی میوه‌های گیاه *Helicteres isora* را در سال ۲۰۱۰ مطالعه نمود و نتایجی را مطرح نمود. عصاره استنی این گیاه فعالیت ضدپلاسمیدی دارد و عصاره استنی-هگزانی بیشترین تأثیر را ایجاد می‌کند [۲]. ابوزید در سال ۲۰۱۰ اثر عصاره‌های برخی گیاهان از جمله: زنجبیل، آویشن، سیاهدانه و شبدر را در از بین بردن مقاومت دارویی باکتری‌ها بررسی کرد. نتایج وی نشان داد که ترکیب عصاره‌ها با هم، نسبت به تأثیر عصاره یک گیاه به تنهایی اثر بیشتری در از بین بردن مقاومت دارویی داشته است [٤]. در انتها پیشنهاد می‌شود در صورت انجام تحقیقات مشابه، اولاً عصاره‌گیری به روش‌های متفاوت انجام گیرد و نتیجه‌ها با هم مقایسه شوند، ثانیاً اثر ضدپلاسمیدی عصاره‌های ترکیبی گیاهان نیز بررسی شده تا نتیجه‌گیری بهتر انجام شود.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از کلیه همکارانی که در انجام این پژوهش ما را یاری نمودند، معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان سرکار خانم دکتر منجمی، مدیر محترم پژوهشی دانشگاه سرکار خانم علیپور، اساتید بزرگوار در دانشگاه‌های بقیه‌الله و کرمان آقایان دکتر اسدی، دکتر شکیبایی، دکتر کلانتری، همکاران ارجمند در آزمایشگاه دکتر مهاجری

Archive of SID
www.SID.ir

اصفهان، جناب آقای دکتر محمدرضا مهاجری، جناب آقای دکتر باقری، جناب آقای محمد صفاتاج، جناب آقای محمدهادی روانبخش، جناب آقای بهنام ابراهیمیان، جناب آقای محمد جعفری، سپاسگزاری و تشکر نموده، پیروزی و بهروزی هر چه بیشتر برایشان آرزو داریم.

منابع

1. Ameena S. M. J. Genetic transformation in antibiotic resistant *Escherichia coli* O157:H7. *Med. J. Islamic World Academy of Sci*. 2010; 18: 2.75 - 84.

2. Shriram V, Jahagirdar S, Latha C, Kumar V and Dhakephalkar P. Antibacterial and antiplasmid activities of *Helicteres isora* L. *Indian J. Med. Res.* 2010; 132: 94 - 9.

3. Khder A. K. Effect of *Allium stivum* and *Myrtus communis* on the elimination of antibiotic resistance and swarming of *Proteus Mirabilis*. *JJBS.* 2008; 1 (3): 124 - 8.

4. Abou Zeid AA, Shalaby MA, Abdel Aziz MI. Control of Some Multi-Resistant Bacteria Infecting Upper Respiratory System Using Certain Essential Oils and Plant Extracts. *Proceeding of Fifth Sci. Envi. Conf*. 2010.

5. Zambare VP, Kothari PS and Kulkarni MV. Plasmid curing activity of plumbagin and its application in bacterial antibiotic resistance. *J. Pure and Applied Microbiol*. 2007; 1 (2): 285 - 8.

6. Lakshmi VV and Thomas CM. Curing of F-like plasmid TP181 by plumbagin is due to interference with both replication and maintenance functions. *Microbiology J*. 1996; 142: 2399 - 406.

7. Chacko S, Ramteke PW and John SA. Amidase from plant growth promoting rhizobacterium. *J. Bacteriol. Res.* 2009; 1 (4): 046 - 050.

8. Kumar G, Singla R and Kumar R. Plasmid Associated Anthracene Degradation by *Pseudomonas* sp. Isolated from Filling Station Site. *Nature and Sci*. 2010; 8 (4): 89 - 94.

9. Khoshkhoo PH and Peighambari SM. Drug resistance patterns and plasmid profiles of *Escherichia coli* isolated from cases of avian colibacillosis. *Veterinary J*. 1995; 2: 97 - 105.

10. Shakibai MR, Heydari MR, Ahadinezhad M and Mohammadi M. Plasmid curing activity of five plant extracts on multiple resistant Plasmid bearing Klebsiella pnumoniae strains. *J. Gillan University of Medical Sci.* 2000; 9 (33 & 34): 1 - 9.

11. Spengler G. Attempts to Reduce Drug Resistance of Bacteria and Cancer Cells. Ph.D. Thesis. University of Szeged. 2006.

12. Ivan J. Oresnik, Shu-Lin L, Christopher KY and Michael FH. Megaplasmid pRme2011a of *Sinorhizobium meliloti* is not required for Viability. *J. Bacteriol*. 2000; 182 (12): 3582 - 6.

13. Molnar A. Plasmid curing in ecosystems of bacteria, efflux pump inhibitors in bacteria and cancer cells. Ph.D. Thesis. University of Szeged. 2006.

14. Zamani I, Kasra Kermanshahi R and Emtiazi G. Plasmid profile study and determination of genetical origin of multiresistance in 10 chozen strains of Escherichia coli. *Iranian J. Biology* 2007; 20 (1): 22 - 33.

15. Schelz Z, Molnar J, Hohmann J. Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils. *Fitoterapia* 2006; 77 (4): 279 – 85.

16. Molnar A, Amaral L and Molnar J. Antiplasmid effect of promethazine in mixed bacterial cultures. *Int. J. Antimicrob Agents* 2003; 22 (3): 217 - 22.

17. Shakibaie MR and Gholamalibeig AH.

Archive of SID

www.SID.ir

Plasmid mediated Cefotaxime and Ceftizoxime resistance in ten strains of Klebsiella pneumoniae isolated from hospital in Kerman, Iran. *J. Kerman University of Med. Sci.* 1999; 6 (1): 29 - 38.

18. Jacoby G.A. Classification of plasmids in *Pseudomonas aeruginosa*. In *Microbiology*. American Society of Microbiology, Washington, D.C. 1977, pp: 119 - 26.

19. Couturier M, Bex F, Berquist PL and Maas WK. Identification and classification of bacterial plasmids. *Microbiol Rev.* 1988; 52: 375 - 95.

20. Molnar J, Beladi I and Holland IB. Plasmid curing action of imipramine in *Escherichia coli* - k12. *Genet Res.* 1978; 31: 197 - 201.

21. Behdani M, Ghazvini K. Mohammadzadeh AR., Sadeghian A. Antibacterial activity of Henna extracts against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeroginosa*. *Ofogh-e-Danesh. GMUHS J.* 2009; 15 (3): 46 - 52.

22. Akin M, Oguz V and Saracoglu H. T. Antibacterial Activity of Essential oil from *Thymbra spicata* var. *spicata* L. and *Teucrium polium* (Stapf Brig.). *International J. Pharmaceutical and Applied Sci*. 2010; 1 (1): 55 - 8.

23. Mousumi S and Dutta Choudhury M. Antimicrobial Activity of Some Selected Plants from Southern Assam. *J. Science & Technol*. 2010; 6 (1): 58 - 62.

Archive of SID

www.SID.ir

Plasmid Curing Activity of Four Plant Extracts on Multiple Resistant Plasmid Bearing Klebsiella Pnumoniae Strains

Mohammadi M (M.Sc.)*, Akkafi HR (M.Sc.), Yazdanshenas Sh (M.Sc.), Adibnejad M (Ph.D.)

Department of Biochemistry, Islamic Azad University, Falavarjan, Iran
*Corresponding author: Department of Biochemistry, Islamic Azad University
P.O.Box: 84515-155, Falavarjan, Iran
Tel: +98- 311-7420145, Fax: +98 – 311-7420134
E. mail: mohamadi@iaufala.ac.ir

Abstract

Background: Antibiotic resistance is a problem around the world.Some bacteria are resistant to these medicines.Medicinal plants and derivatives are good source for therapy of these diseases.

Objective: The curing of four medicinal plant extracts (*Thymus caramanicus (T.c), Dracocephalum polychaetum (D.p), Adianthum capillus-veneris (A.c), Viola tricolor (V.t)*) on plasmid bearing strains of klebsiella pneumoniae resistance to multiple antibiotics were investigated.

Methods: Klebsiella pneumoniae resistance to multiple antibiotics were isolated from hospital infectious samples. Alcoholic and maceration extraction were carried out from leaves, flowers or roots of the above plants. Minimum inhibitory concentrations (MIC) of each plant extract was measured. At the same time the sub inhibitory concentration (SIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) activity of each plant extract was carried out in order to cure plasmids from plasmid bearing strains. The sensitivity of the strains treated with SIC of each plant extracts to ampicillin, amoxicillin, cefotaxime, ceftizoxime, vancomycin has been measured.
The morphological changes and capsule staining of klebsiella pneumoniae has been investigated with fluorescent microscope.

Results: Minimum inhibitory concentrations (MIC) of each plant extract indicated that all of them have anti microbial activity and were able to inhibit the growth of resistant strains of kleb. pneumoniae. Furthermore the *T.c* and *A.c* extract had highest anti microbial activity as compared to other plant extracts.
Kleb. pneumoniae cells treated with *T.c* and *A.c* extract, the cells aggregated and change their morphology, similarly, production of capsule was also lost. In addition gram stain properties of bacteria has been changed. That is the high mutagenic properties of these plant extracts on gene or gene expression in capsule modulation.
The agarose gel electrophoresis (0.7%) of the treated cells and untreated one and observation of the gel with U.V. gel documentation system indicated that there were any physical loss of plasmid band on the gel.

Conclusions: From above data it could be concluded that the above plants extract though they have antibacterial activity they didn't exert any curing effect on the plasmid bearing microorganisms, but antibacterial effects of *T. c* and *A. c* extracts are considerable.

Keywords: Drug Resistance, Plant Extracts, Plasmid curing, Klebsiella Pueumoniae

Archive of SID

www.SID.ir