Downloaded from jams.arakmu.ac.ir at 9:36 +0430 on Monday July 15th 2019

JAMS
Journal of Arak University of Medical Sciences
2019; 22(2)
Journal Homepage: http://jams.arakmu.ac.ir

ORIGINAL RESEARCH

The Evaluation of Five Plant Extracts Inhibitory Potential against Bacterial Quorum Sensing of Staphylococcus Aureus

Elham Pishgar[1*], Milad Makhfian[2]

1. Department of Microbiology, Islamic Azad University of Jahrom, Fars, Iran.
2. Department of Plant Pathology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

ARTICLE INFORMATION

Article history

Received: *05 December 2018*

Accepted: *30 January 2019*

Published online: *10 June 2019*

Keywords

Agrobacterium
AHL
Anti-quorum sensing
Biofilm
QS
Raspberry
Staphylococcus aureus

**** Corresponding Author:***

Elham Pishgar; P.O. Box 7414785318, , Islamic Azad University of Jahrom, Imam Mahdi University Complex, 15th kilometer, Jahrom-Shiraz Road, Jahrom, Fars Province, Iran.

Fax: *+98 71 5422 6889*

Email: *elhampishgar1504@gmail.com*

ABSTRACT

Background and Aim: A variety of bacteria like Staphylococcus aureus utilize quorum sensing to perform their important activities such as biofilm formation and production of virulence factors. Interfering with the bacterial QS will disable the bacteria to perform above-mentioned vital activities. The principal aim of the study was to evaluate the effects of five plant extracts against bacterial Quorum sensing of Staphylococcus aureus.

Materials and Methods: Thirteen strains of Staphylococcus aureus were isolated from patients with dental implant infection and identified. The plant species were collected from vicinity gardens of Fars Province and extracted using 96% ethanol. The anti-QS and antimicrobial susceptibility methods were then carried out to evaluate their bactericidal and QS properties with the use of Agrobacterium tumefaciens NTL/PZLR4. Furthermore, the biofilm production of the isolates was evaluated by microtiter plate (MTP) assay.

Ethical Considerations: This study with research ethics codes 01-16-1-1959 and 73/118248 has been approved by research ethics committee at Islamic Azad University, Jahrom and research sciences branch, respectively.

Findings: The results of the study disclosed that the extract of raspberry blossom possesses significantly ($p<0.05$) anti-QS property (>21 mm). The anti-QS activity was proved by creating clear halo sides of the wells formed by Agrobacterium tumefaciens NTL/PZLR4. Moreover, the extracts of tarragon, wheat flower, flixweed and basil showed antimicrobial properties.

Conclusion: According to the anti-biofilm and anti-QS properties of raspberry blossom extract against the isolates of Staphylococcus aureus, it could be considered as a mouthwash against dental bacterial infection with the identification of active compounds in the raspberry.

© Copyright (2019) Arak University of Medical Sciences

Use your device to scan and read this article online:

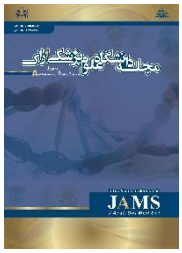
Pishgar E., Makhfian M. The Evaluation of Five Plant Extracts Inhibitory Potential against Bacterial Quorum Sensing of Staphylococcus Aureus. J Arak Uni Med Sci. 2019; 22(2): 11-21.

This open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution NonCommercial 4.0 License (CC BY-NC 4.0).

www.SID.ir

Downloaded from jams.arakmu.ac.ir at 9:36 +0430 on Monday July 15th 2019

JAMS
مجله دانشگاه علوم پزشکی اراک
دوره بیست و دو، شماره دو، خرداد و تیر ۱۳۹۸
journal homepage: http://jams.arakmu.ac.ir



مقاله پژوهشی

بررسی خاصیت بازدارندگی ۵ عصاره گیاهی مختلف بر مکانیسم کوئوروم سنسینگ سویه استافیلوکوکوس اورئوس

الهام پیشگر [۱*]، میلاد مخفیان [۲]

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی جهرم، فارس، ایران.

۲. گروه بیماری‌شناسی گیاهی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

اطلاعات مقاله

تاریخ دریافت: ۹۷/۰۹/۱۴

تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۱/۱۰

تاریخ انتشار: ۹۸/۰۳/۲۰

واژگان کلیدی

آگروباکتریوم

استافیلوکوکوس اورئوس

بیوفیلم

تمشک

ضد حساسیت جمعیتی

AHL

QS

***نویسنده مسئول:**

الهام پیشگر

آدرس پستی: ایران، استان فارس، جهرم، ۱۵ کیلومتری جاده جهرم-شیراز، مجتمع دانشگاهی امام مهدی (عج)،دانشگاه آزاد اسلامی جهرم، کد پستی: ۷۴۱۴۷۸۵۳۱۸.

نمابر: +98 71 5422 6889

E-mail:
elhampishgar1504@gmail.com

چکیده

زمینه و هدف: بسیاری از باکتری‌ها به ویژه استافیلوکوکوس اورئوس از مکانیسم حساسیت جمعیتی برای انجام بسیاری از فعالیت‌های ضروری خود مانند تولید بیوفیلم و ایجاد فاکتورهای بیماری‌زایی استفاده می‌کنند. هرگونه تداخل در این سیستم باعث ناتوانی باکتری در انجام فعالیت‌های فوق خواهد شد. این مطالعه با هدف ارزیابی پتانسیل ۵ عصاره گیاهی علیه حساسیت جمعیتی سویه ا. اورئوس انجام گردید.

مواد و روش‌ها: سیزده جدایه ا. اورئوس از بیماران دچار عفونت ایمپلنت دندانی جداسازی و شناسایی شدند. گونه‌های گیاهی از باغات استان فارس جمع آوری و عصاره گیری به واسطه حلال اتانول ۹۶ درصد انجام پذیرفت. اثر عصاره گیاهان به واسطه سویه نشان‌گر آگروباکتریوم تومی فشنس NTL/PZLR4، با آزمون ضدحساسیت جمعیتی و هم‌چنین خاصیت باکتری‌کشی با آزمون ضدمیکروبی مورد بررسی قرار گرفت. در ضمن قدرت تولید بیوفیلم جدایه‌ها به روش میکروتیترپلیت (MTP) ارزیابی گردید.

ملاحظات اخلاقی: این مطالعه با کد ۱۹۵۹-۱-۱۶-۰۱ و ۷۳/۱۱۸۲۴۸ به تأیید کمیته اخلاق معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحدهای جهرم و علوم تحقیقات تهران رسیده است.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که عصاره شکوفه تمشک به‌صورت معنی داری ($p < ۰/۰۵$) خاصیت ضد حساسیت جمعیتی دارد (< ۲۱ میلی‌متر). ایجاد هاله روشن در اطراف چاهک توسط سویه نشان‌گر، اثرات ضد حساسیت جمعیتی عصاره شکوفه تمشک را تایید نمود. عصاره گیاهان ترخون، گل گندم، خاکشیر و ریحان صرفاً خاصیت ضدمیکروبی از خود نشان دادند.

نتیجه‌گیری: با توجه به ویژگی ضد بیوفیلمی و ضد حساسیت جمعیتی عصاره شکوفه تمشک، می‌توان از ترکیبات موثره موجود در این گیاه به عنوان دهان‌شویه جهت مقابله با عفونت ایمپلنت دندانی استفاده نمود.

تمامی حقوق انتشار این اثر، متعلق به دانشگاه علوم پزشکی اراک می‌باشد.

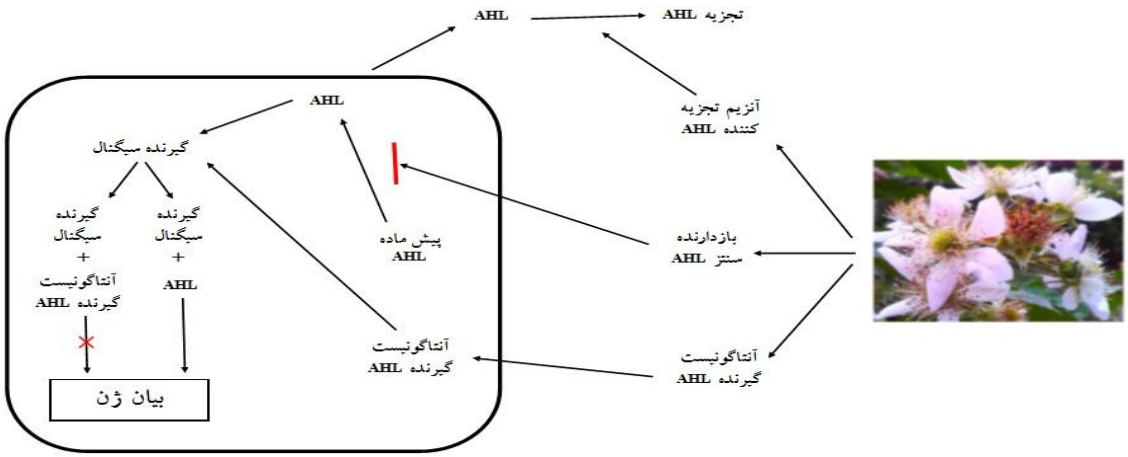
www.SID.ir

Downloaded from jams.arakmu.ac.ir at 9:36 +0430 on Monday July 15th 2019

۱. مقدمه

به فرآیندی که باعث هماهنگی و ایجاد سیستم ارتباطی بین سلول‌ها توسط ریز مولکول‌های خارج سلولی و قابل انتشار به‌نام خودالقاگرها (autoinducers) و به‌دنبال آن موجب القای بیان ژن‌ها از جمله ژن‌های ویرولانس می‌گردد، حساسیت جمعیتی، حدنصاب حسگری یا Quorum Sensing (QS) اطلاق می‌گردد (۱). این پدیده در واقع با تراکم و قدرت انتشار پایین ماتریکس پلی ساکاریدی موجود در بیوفیلم، شرایط ایده آلی را برای تجمع سیگنال‌ها و القای تولید فاکتورهای بیماری‌زایی به واسطه پدیده کوئوروم سنسینگ (QS) فراهم نموده و باکتری‌ها را آماده حمله به میزبان می‌سازد (۲).

تحقیقات اخیر نشان داده است که بسیاری از باکتری‌های گرم‌منفی و مثبت که بیماری‌زای انسانی و گیاهی هستند از سیستم حدنصاب حسگری به منظور تنظیم تولید فاکتورهای بیماری‌زایی استفاده می‌کنند. در این راستا می‌توان نمونه‌هایی از باکتری‌های گرم منفی مانند جنس‌های *سودوموناس* (*Pseudomonas*)، *بورسلا* (*Burcella*)، *رالستونیا* (*Ralstonia*)، *ویبریو* (*Vibrio*)، *آگروباکتریوم* (*Agrobacterium*) و *یرسینیا* (*Yersinia*) و باکتری‌های گرم مثبت مانند جنس‌های *باسیلوس* (*Bacillus*)، *استرپتومایسس* (*Streptomyces*)، *استرپتوکوکوس* (*Streptococcus*)، *استافیلوکوکوس* (*Staphylococcus*) و *انتروکوکوس* (*Entrococcus*) را نام برد. شایان ذکر است که باکتری‌های گرم مثبت از QS به منظور تولید پپتیدهای ضدمیکروبی (اگزوتوکسین) و هم‌چنین تولید بیوفیلم استفاده می‌نمایند (۳). تاکنون پیام‌رسان‌های مختلفی از فرآیند کوئروم سنسینگ شناسایی شده‌اند که ان-اسیل هموسرین لاکتون (N-AHL) بارزترین آن‌ها در باکتری‌های گرم منفی به شمار می‌آید. سیستم وابسته به AHL در باکتری‌های گرم منفی نقش به‌سزایی در تنظیم تولید عوامل بیماری‌زایی دارند. کاربردهای تجزیه‌ی مولکول‌های پیام‌رسان روشی نوین و قابل تامل برای محققان در مباحث مقابله با عفونت‌های باکتریایی می‌باشد (۴). به‌طور کلی رشد میکروارگانیسم‌ها در بیوفیلم‌ها می‌تواند مقاومتشان را نسبت به عوامل میکروبی افزایش دهند. به همین خاطر، درمان با ضد میکروب‌ها اغلب در ریشه‌کن کردن بیو فیلم‌ها از ناحیه عفونت شکست می‌خورد، بنابراین عوامل ضدبیوفیلمی جدیدی با اهداف جدید و روش‌های جدیدی در عملکرد مورد نیاز است (۵). چندین روش ارزیابی شده است که به کاهش بیماری‌زایی یا تشکیل بیوفیلم به وسیله کاهش غلظت سیگنال در محیط باکتریایی کمک می‌کنند. مهار QS به سه روش مهار سنتز سیگنال، مهار اتصال به گیرنده‌های پروتئینی و تخریب سیگنال‌های به‌کار رفته مانند آسیل هموسرین لاکتون انجام می‌شود (۶، ۷) (شکل ۱).



شکل ۱. مکانیسم مهار خاصیت ضد حدنصاب حسگری که توسط گیاهان صورت می‌گیرد.

www.SID.ir

Downloaded from jams.arakmu.ac.ir at 9:36 +0430 on Monday July 15th 2019

فعالیت‌های سرکوب‌کننده حد نصاب حسگری Quorum Quenching (QQ) نامیده می‌شود، این روش با هدف از بین بردن باکتری‌ها تعریف نشده است، بلکه به این معنا است که بقای باکتری را با استفاده از داروهایی غیر از داروهای شیمیایی می‌توان محدود کرد که روشی بسیار کارآمد برای جایگزینی آنتی بیوتیک‌ها با توجه به پدیده مقاومت آنتی بیوتیکی می‌باشد (۸). به منظور درمان و پیشگیری از بیماری‌ها و با توجه به عوارض جانبی که داروهای شیمیایی به جا می‌گذارند، نیازمند داروهایی با کمترین عوارض و درجه اطمینان بالا در طولانی مدت هستیم (۹). گیاهان دارای ترکیبات فراوانی هستند که می‌توان از آن‌ها در راستای اهداف این تحقیق استفاده کرد. با توجه به تنوع گیاهی و خواص ضدمیکروبی آن‌ها در برابر عفونت‌ها، در این تحقیق تلاش شده است که از چند تیره مختلف، هر کدام یک گونه مورد بررسی قرار گیرد. در این پژوهش انتخاب گیاهان به‌صورت تصادفی از چند تیره مختلف به دلیل تنوع آن‌ها و البته با توجه به تحقیقات پیشین از نظر داشتن ترکیبات خاصی که قابلیت اختلال در فرآیند QS را دارند از جمله یوژنول، لیمولین، لینالول و سایر موارد انجام شده است. هدف اصلی از انتخاب گیاهان، گونه‌هایی بود که ترکیبات خاصی در پدیده باکتریایی QS دخیل دارند و هنوز پژوهشی بر روی آن‌ها انجام نشده است. در این راستا، شکوفه تمشک (*Rubus ulmifolius*) از تیره گلسرخیان، ترخون (*Artemisia dracunculus*) از تیره کاسنیان، گل گندم (*Centaurea cyanus*) از تیره مینا، خاکشیر (*Descurainia sophia*) از تیره شب بویان و ریحان (*Ocimum basilicum*) از تیره نعناعیان انتخاب شدند.

این مطالعه با هدف بررسی پتانسیل بازدارندگی ویژگی حساسیت جمعیتی عصاره‌های شکوفه تمشک، ترخون، گل گندم، خاکشیر و ریحان با کمک سویه گزارشگر *آگروباکتریوم تومی فشنس* NTL/PZLR4 در جهت بررسی کنترل بیوفیلم تولید شده توسط سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* در عفونت‌های ناشی از ایمپلنت دندانی انجام گرفت. هم‌چنین هدف‌گذاری در استفاده از گیاهان دارویی در راستای درمان و پیشگیری از عفونت‌هایی با منشا باکتریایی مورد بررسی قرار گرفت.

۲. ملاحظات اخلاقی

این مطالعه با کدهای ۱۹۵۹-۱-۱۶-۰۱ و ۷۳/۱۱۸۲۴۸ توسط کمیته اخلاق معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحدهای جهرم و علوم تحقیقات تهران به ثبت رسیده است.

۳. مواد و روش‌ها

سویه‌های باکتریایی و محیط‌های کشت

در این مطالعه از جدایه‌های باکتریایی *استافیلوکوکوس اورئوس* جداشده از عفونت‌های اطراف ایمپلنت دندانی و سویه *آگروباکتریوم تومی فشنس* NTL/PZLR4 (تهیه شده از دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران) به عنوان گزارشگر (biosensor) دریافت مولکول‌های اسیل هموسرین لاکتون (AHL) استفاده گردید. بعد از نمونه‌گیری از بیماران مراجعه‌کننده به دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شیراز، نمونه‌ها در محیط کشت تیوگلیکولات (Thioglycollate broth) به آزمایشگاه انتقال یافت، سپس جهت جداسازی و تشخیص *استافیلوکوکوس اورئوس*، تست‌های بیوشیمیایی و مولکولی از جمله ژن NUC انجام گردید (۱۰). سویه *آگروباکتریوم تومی فشنس* NTL/PZLR4 به‌صورت غیرهوازی بر روی محیط LB (Luria Bertani) و به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد. علاوه بر این، از محیط کشت تریپتیک سوی براث (Tryptic Soy Broth) جهت آزمون میکروتیتر پلیت (MTP) و Soft STA (Top Agar) مربوط به شرکت مرک آلمان (Merck) به منظور انجام آزمون ضدحساسیت جمعیتی استفاده گردید. در این مطالعه از مولکول سیگنالی C12-HSL: N-(3-Oxooctanoyl)-L-homoserine lactone (C12H19NO4, Molecular Weight 241.28) خریداری شده از شرکت سیگما استفاده شد (۱۱).

www.SID.ir

Downloaded from jams.arakmu.ac.ir at 9:36 +0430 on Monday July 15th 2019

تشخیص مولکولی *استافیلوکوکوس اورئوس*

جهت تعیین هویت مولکولی جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* تمامی ایزوله‌ها از نظر حضور ژن NUC با استفاده از آزمون PCR بررسی شدند. سویه استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 25923 به عنوان کنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفت (۱۲) (جدول ۱ و ۲).

جدول ۱. ترادف پرایمر ژن NUC

نام ژن	اندازه (جفت باز)	توالی پرایمر (5'->3')	منبع
NUC	279	5-GCGATTGATGGTGATACGGTT-3 5-AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC-3	(۱۲)

جدول ۲. شرایط دمایی و زمانی سیکل PCR ژن NUC

Genes	Initial Denaturation	Denaturation	Annealing	Extension	Final Extension
NUC	94 °C for 1 min	94 °C for 30 Sec	55 °C for 30 Sec	72 °C for 1 min	72 °C for 5 min

مواد گیاهی و عصاره‌گیری آن‌ها

گونه‌های گیاهی تمشک (*Rubus ulmifolius*)، ترخون (*Artemisia dracunculus*)، گل گندم (*Centaurea cyanus*)، خاکشیر (*Descurainia sophia*) و ریحان (*Ocimum basilicum*) از باغات اطراف استان فارس جمع‌آوری گردید. شایان ذکر است گیاهان نامبرده توسط آقای دکتر امیر برجیان، دارای دکتری تخصصی سیستماتیک گیاهی گروه باغبانی از دانشگاه آزاد واحد جهرم، مورد شناسایی قرار گرفت. به منظور تهیه عصاره گیاهی، در ابتدا نمونه‌ها در دمای اتاق به مدت ۷ روز دور از نور آفتاب و باد خشکانیده و سپس آسیاب شدند. یکصد گرم از هر کدام از نمونه‌های گیاهی در مجموع با ۶۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درصد مخلوط و به مدت ۱۰ ساعت با دستگاه سوکسله عصاره‌گیری و ترکیبات ریز ناخواسته از عصاره‌های گیاهی با کاغذ صافی فیلتر شد. سپس تمامی ترکیبات و هم‌چنین حلال آلی استفاده شده، با دستگاه روتاری (Heidolph، آلمان) در دمای کمتر از ۴۰ درجه سانتی‌گراد از عصاره‌ها حذف شدند. عصاره‌های غلیظ به‌دست آمده با غلظت معینی از DMSO (Dimethyl Sulfoxide) رقیق و از پالایه میلی پور ۰/۲۲ میکرونی عبور داده شد و در نهایت عصاره‌های به‌دست آمده در ویال‌های استریل و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (۳).

آزمون حساسیت ضدمیکروبی

در راستای بررسی میزان فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌های گیاهی تمشک، ترخون، گل گندم، خاکشیر و ریحان، در ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از کشت ۲۴ ساعته باکتری *اگروباکتریوم تومی فشنس* (OD600=۰/۱) در محیط کشت Mueller-Hinton (MH) پخش گردید. از هر کدام از عصاره‌ها ۲۰ میکرولیتر به دیسک‌های استریل ۶ میلی‌متری آغشته شدند. دیسک‌های تتراسایکلین به عنوان آنتی‌بیوتیک‌های استاندارد به همراه دیسک‌های آغشته به عصاره‌های گیاهی در پلیت‌ها قرار داده شده و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری گردید. فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌ها با اندازه‌گیری قطر هاله بازدارندگی ارزیابی شد (۳).

آزمون ضد حساسیت جمعیتی

۵ میلی‌گرم از محیط کشت STA (۱/۳ گرم آگار، ۲ گرم تریپتوفان، ۱ گرم سدیم کلراید، ۲۰۰ میلی لیتر آب دیونیزه) با ۱۰۰ میکرولیتر از کشت ۲۴ ساعته سویه *آگروباکتریوم تومی فشنس NTL/PZLR4*، ۵۰ میکرولیتر X-Gal و ۲۰ میکرولیتر از ۱۰۰ میکروگرم در لیتر C12-HSL به عنوان منبع AHL خارجی تهیه شد. مواد فوق به آرامی ترکیب شده و بلافاصله بر روی سطحی نازک از محیط LB agar که از قبل در همان پلیت آماده شده ریخته و بعد از کمی سرد شدن این محیط دو لایه‌ای LB-STA، در آن چاهک‌هایی به قطر ۵ میلی‌متر ایجاد گردید. چاهک‌ها با ۳۰ تا ۴۰ میکرولیتر از عصاره‌های گیاهی رقیق شده با حلال DMSO پر شدند. حلال DMSO به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. پلیت‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ روز نگهداری شد. مهار کوئروم سنسینگ

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from jams.arakmu.ac.ir at 9:36 +0430 on Monday July 15th 2019

با ایجاد هاله روشن در اطراف چاهک‌ها در برابر یک پس زمینه آبی رنگ از باکتری *NTL/PZLR4* فعال ایجاد می‌شود (۱۱).

توانایی تشکیل بیوفیلم به روش میکروتیتر پلیت (MTP)

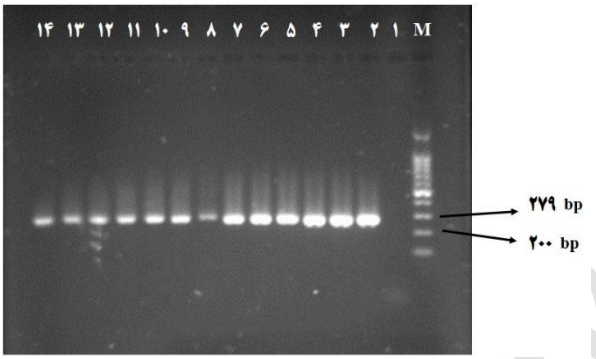
به منظور بررسی خصوصیات فنوتیپیکی تشکیل بیوفیلم از روش MTP (Microtiter Plate Assay) استفاده گردید. در این روش محیط کشت Trypticase Soy Broth درون چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای ریخته شد و سپس سوسپانسیون باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* معادل نیم مک فارلند به هر چاهک اضافه شد. پس از گرمخانه‌گذاری برای حذف باکتری‌های متصل نشده به دیواره چاهک‌ها، از بافر PBS (Phosphate Buffer Solution) استفاده شد و پس از تثبیت باکتری‌های متصل شده با متانول، رنگ‌آمیزی پلیت الیزا با سافرانین انجام گرفت و در نهایت در طول موج ۴۹۰ نانومتر با استفاده از دستگاه قرائت کننده الیزا (ELISA Reader)، حداکثر طول موج جذبی (OD) هر چاهک خوانده شد. توانایی تشکیل بیوفیلم توسط جدایه‌های موردبررسی بر اساس میزان جذب سافرانین متصل شده به سلول‌های موجود در بیوفیلم، طبقه‌بندی گردیده و با استفاده از روش محاسبه cut-off، نتایج به‌دست آمده مورد بررسی قرار گرفت (۱۳). سپس با هدف تاثیر عصاره شکوفه تمشک در اتصال سویه‌ها به دیواره چاهک و ایجاد بیوفیلم، غلظت‌های ۱۰، ۳۰ و ۵۰ میکرولیتر عصاره گیاهی رقیق شده با DMSO به محیط کشت تریپتیک سوی براث اضافه شده و مراحل فوق انجام پذیرفته و نتایج بدست آمده با مرحله ی قبل مقایسه و مورد بررسی قرار گرفت.

تحلیل آماری

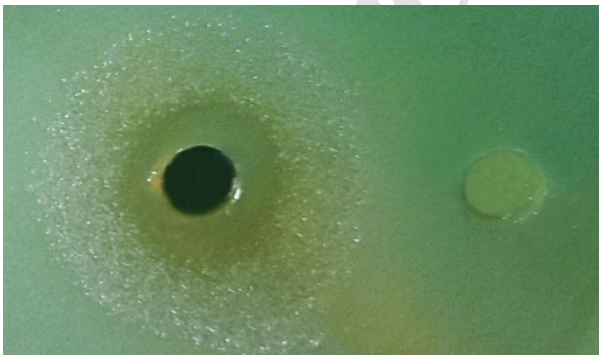
نتایج یافته‌ها با استفاده از نسخه بیست و یکم نرم افزار SPSS و آزمون مربع کای، تست دقیق فیشر و آزمون کروسکال-والیس مورد بررسی قرار گرفت. سطح معنی‌داری برابر با $p < ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

۴. یافته‌ها

تشخیص و شناسایی جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* پس از آزمون‌های بیوشیمیایی استاندارد به روش مولکولی و از طریق تکثیر ژن اختصاصی ترمونوکلئاز (*NUC*) به روش PCR انجام شد. تمامی جدایه‌های مورد آزمایش دارای قطعه *NUC*، مثبت گزارش شدند (شکل ۲). در این پژوهش، خاصیت ضد حساسیت جمعیتی از میان ۵ عصاره گیاهی شکوفه تمشک، ترخون، گل گندم، خاکشیر و ریحان مورد آزمایش قرار گرفت. عصاره گیاهی شکوفه تمشک با پدیدار شدن هاله کرمی رنگ در اطراف چاهک‌ها در سویه *آگروباکتریوم تومی فشنس NTL/PZLR4* مشخص گردید (شکل ۳). حلال DMSO به عنوان کنترل منفی، هیچ هاله‌ی ضدمیکروبی و یا ضد QS نداشت، در حالی‌که آنتی بیوتیک تتراسایکلین به عنوان کنترل مثبت دارای میزان قابل توجهی خاصیت ضدمیکروبی بود، بدون این‌که خاصیت ضد QS داشته باشد (جدول ۳).



شکل ۲. محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در ژل آگارز ۱/۵ درصد. ردیف M: مارکر bp ۱۰۰، ردیف ۱: کنترل منفی، ردیف ۲ تا ۱۳: نمونه بالینی مثبت، ردیف ۱۴: کنترل مثبت.



شکل ۳. آزمون ارزیابی خاصیت ضد QS عصاره شکوفه تمشک با استفاده از سویه آگروباکتریوم تومی فشنس NTL/PZLR4. چاهک سمت چپ: حلقه درونی و بیرونی اطراف چاهک به ترتیب مربوط به خاصیت ضدمیکروبی و ضد QS عصاره شکوفه تمشک. چاهک سمت راست: حلال DMSO بدون خاصیت ضدمیکروبی و یا ضد QS.

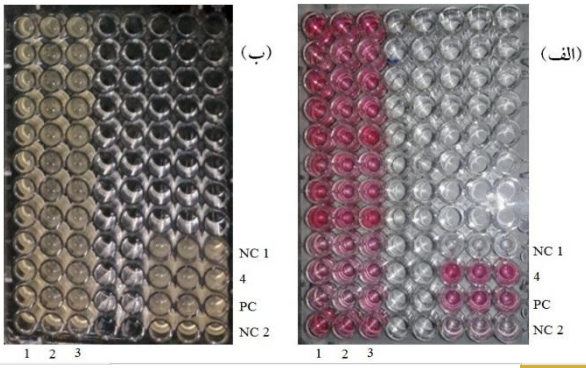
www.SID.ir

Downloaded from jams.arakmu.ac.ir at 9:36 +0430 on Monday July 15th 2019

جدول ۳. میزان خاصیت ضدحساسیت جمعیتی (انحراف معیار± میلی‌متر).

گونه گیاهی	محل نمونه گیری	خاصیت ضدمیکروبی	خاصیت ضد حدنصاب حسگری
خاکشیر	برگ و گل	(۷/۵ ±۰/۳)	–
ترخون	برگ	(۶/۵ ±۰/۴)	–
گل گندم	گل	(۸/۲ ±۰/۶)	–
تمشک	شکوفه	(۷/۴ ±۰/۵)	(۲۱ ±۰/۵)
ریحان	برگ	(۷/۸ ±۰/۳)	–
DMSO	–	–	–
تتراسایکلین	–	(۳۴ ±۰/۴)	–

از آن‌جایی‌که هدف اصلی این تحقیق، ارزیابی خاصیت ضدحساسیت جمعیتی عصاره‌های گیاهی بوده و هم‌چنین با توجه به این‌که تشکیل بیوفیلم در باکتری‌ها تحت تاثیر فرآیند QS می‌باشد، از این‌رو جهت بررسی قدرت ضدبیوفیلم عصاره شکوفه تمشک از آزمون میکروتیترپلیت استفاده گردید. در این روش خاصیت ضد بیوفیلم عصاره‌ها با مانع شدن از اتصال جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* به دیواره‌ی چاهک در پلیت الیزا مشخص گردید. *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* و محیط کشت تریپتیک سوی براث به عنوان کنترل‌های منفی و *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 33591 به عنوان کنترل مثبت در این مطالعه استفاده شد (۱۴). نتایج نشان داد در پلیت‌های الیزا که عصاره گیاهی تمشک تلقیح شده بودند، اثری از تولید بیوفیلم وجود نداشت (شکل ۴). این در حالیست که ۱۱ جدایه بیوفیلم قوی و ۲ جدایه بیوفیلم متوسط تولید کرده بودند (جدول ۴). هم‌چنین خاطر نشان می‌شود در این مطالعه تمامی جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* در عدم حضور عصاره گیاهی دارای قدرت تولید بیوفیلم بودند (جدول ۵).



شکل ۴. ارزیابی تشکیل بیوفیلم به روش میکروتیتر پلیت با ۳ تکرار. (4-1): ۱۳ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس؛ NC 1: محیط کشت تریپتیک سوی براث (کنترل منفی)؛ NC 2: استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس (کنترل منفی)؛ PC: استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 33591 (کنترل مثبت). الف) جذب سافرانین توسط سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس در عدم حضور عصاره شکوفه تمشک. ب) عدم جذب سافرانین در حضور عصاره گیاهی در چاهک‌ها.

جدول ۴. فراوانی سویه‌های تشکیل‌دهنده بیوفیلم به روش میکروتیتر پلیت (MTP)

نوع بیوفیلم	تعداد سویه‌های تشکیل دهنده بیوفیلم	روش محاسبه (رابطه میزان جذب و تشکیل بیوفیلم)	نتایج حاصل از میانگین حداکثر جذب نور (OD)*
قوی	11(84.61)	$OD > 4\times ODc^2$	OD > 0.332
متوسط	2(15.38)	$2\times ODc < OD \leq 4\times ODc$	0.166 < OD ≤0.332
ضعیف	-	$ODc < OD \leq 2\times ODc$	0.083 < OD ≤ 0.166
عدم اتصال	-	OD ≤ 0.083	OD ≤ 0.083

*ODc کنترل، برابر با ۰/۰۸۳ می‌باشد که سایر چاهک‌ها با آن مقایسه شد.

جدول ۵. توانایی تشکیل بیوفیلم جدایه‌ها در عدم حضور و حضور عصاره شکوفه تمشک ($p < ۰/۰۵$) به روش MTP

جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس	میزان جذب نور در عدم حضور عصاره (توانایی تشکیل بیوفیلم)	میزان جذب نور در حضور عصاره در غلظت ۱۰ میکرولیتر	میزان جذب نور در حضور عصاره در غلظت ۳۰ میکرولیتر	میزان جذب نور در حضور عصاره در غلظت ۵۰ میکرولیتر

Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from jams.arakmu.ac.ir at 9:36 +0430 on Monday July 15th 2019

جدایه شماره ۱ تا ۱۳	OD > 0.332(قوی) 0.166<OD≤0.332(متوسط)	OD > 0.332(قوی) 0.166<OD≤0.332(متوسط)	0.166<OD≤0.332(متوسط) 0.083<OD ≤ 0.16(ضعیف)	OD ≤ 0.083 (عدم اتصال)
ا. اپیدرمیدیس (کنترل منفی)	0.083<OD ≤ 0.16(ضعیف)	0.083<OD ≤ 0.16(ضعیف)	OD ≤ 0.083(عدم اتصال)	OD ≤ 0.083 (عدم اتصال)
ا. اورئوس ATCC 33591 (کنترل مثبت)	OD > 0.332(قوی)	OD > 0.332(قوی)	0.166<OD≤0.332(متوسط)	OD ≤ 0.083 (عدم اتصال)
TSB(کنترل منفی)	OD ≤ 0.083(عدم اتصال)	OD ≤ 0.083(عدم اتصال)	OD ≤ 0.083(عدم اتصال)	OD ≤ 0.083 (عدم اتصال)

۵. بحث

در این مطالعه اثر عصاره شکوفه تمشک بر خاصیت‌های حساسیت جمعیتی و قدرت تولید بیوفیلم در جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* از عفونت ایمپلنت دندانی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاکی از بازدارندگی QS با ممانعت از هیدرولیز X-gal در سویه گزارشگر *آگروباکتریوم تومی فشنس NTL/PZLR4* به‌واسطه‌ی عصاره شوفه تمشک می‌باشد. هم‌چنین عصاره شکوفه تمشک مانع از اتصال و تضعیف اتصال جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* در جهت تولید بیوفیلم به دیواره چاهک‌های پلیت الیزا شد که این بدان معناست که عصاره شکوفه تمشک دارای خاصیت ضد بیوفیلم نیز می‌باشد. ارتباط سلول به سلول یکی از مهم‌ترین رفتارهای بیولوژیکی باکتری‌ها بوده که بیان ژن را در آلودگی باکتریایی تنظیم می‌نماید. در واقع باکتری‌ها از سیگنال‌های مولکولی جهت ایجاد ارتباط و پاسخ مناسب به رفتارهای اجتماعی هدف‌مند نسبت به تحریکات محیطی استفاده می‌نماید. این پدیده که تحت عنوان Quorum Sensing نام دارد، یکی از روش‌های مطمئن در بررسی اثر مواد طبیعی و غیرشیمیایی علیه باکتری‌های بیماری‌زا و هم‌چنین رفع مشکلاتی که در اثر ایجاد مقاومت در باکتری‌ها به دلیل کاربرد بی رویه آنتی بیوتیک‌ها پدید می‌آیند می‌باشد. با توجه به این‌که بسیاری از عوامل حیاتی باکتری‌ها از جمله تولید فاکتورهای بیماری‌زایی و یا عوامل وابسته به بیماری‌زایی تحت سیطره کوئوروم سنسینگ می‌باشد، بنابراین یافتن هرگونه ترکیبات طبیعی که در چیره شدن این پدیده نقش داشته باشد می‌تواند به عنوان روشی نوین در مقابله با عوامل بیماری زا و کاهش آلودگی‌ها مطرح باشد (۳). تحقیقاتی وجود دارد که نشان می‌دهد بعضی از گیاهان ترکیباتی را تولید می‌نمایند که قادر هستند سیگنال‌های مولکولی باکتریایی را تحت تاثیر قرار داده و باعث بازدارندگی رفتارهایی شوند که تحت کنترل پدیده QS هستند. پژوهش حاضر با هدف بررسی پتانسیل بازدارندگی ویژگی حدنصاب حسگری ۵ عصاره گیاهی شکوفه تمشک (*Rubus ulmifolius*)، ترخون (*Artemisia dracunculus*)، گل گندم (*Centaurea cyanus*)، خاکشیر (*Descurainia sophia*) و ریحان (*Ocimum basilicum*) با کمک مدل آزمایشگاهی *آگروباکتریوم تومی فشنس NTL/PZLR4* انجام گرفت. باکتری مذکور جهت شناسایی مهار سیگنال خارجی AHL با ۱۲ زنجیره کربنی (C12) محیط به‌کار گرفته شد. در این سویه با توجه به این‌که ژن *lacZ* با پروموتر وابسته به QS ترکیب شده است، فعال شدن این پروموتر به واسطه حضور سیگنال خارجی AHL منجر به بیان پیوسته بتاگالاکتوزیداز (که با شکستن گروه مولکولی رنگی (chromophore) از X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indoyl-β-Dgalactopyranoside (X-gal) تولید رنگ آبی می‌نماید) می‌شود. ترکیبات ضد QS باعث ممانعت از پروموتر وابسته به QS و نهایت بیان ژن *lacZ* می‌شود، از این‌رو از هیدرولیز X-gal و ظهور رنگ آبی جلوگیری به عمل می‌آید (۱۲). در این تحقیق، باکتری *آگروباکتریوم تومی فشنس NTL/PZLR4* به عنوان استرین گزارشگر دریافت مولکول‌های اسیل هموسرین لاکتون (AHL) استفاده گردید و عدم تشکیل رنگ آبی در این استرین با حضور سیگنال خارجی نشان‌دهنده بازدارندگی QS توسط عصاره گیاهی شکوفه تمشک می‌باشد. سیستم QS یک باکتری بیماری‌زا را به روش‌های مختلفی می‌توان مختل کرد که تجزیه آنزیمی مولکول‌های پیام‌رسان، رایج‌ترین این شیوه‌هاست. اما اختلال در تولید AHL از طریق

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from jams.arakmu.ac.ir at 9:36 +0430 on Monday July 15th 2019

LuxI و اختلال در اتصال آن به پروتئین گیرنده LuxR نیز از جمله روش‌های دیگر خاموش کردن QS است. در این تحقیق عصاره شکوفه تمشک واجد توانایی اختلال در عملکرد LuxI و LuxR یافت شد که نتیجه بسیار ارزشمندی است و حاکی از وجود آنتاگونیست‌هایی با توانایی‌های چندجانبه برای مختل کردن QS است. نتایج به‌دست‌آمده از مطالعه براکمن و همکاران در سال ۲۰۱۵ نشان داد که بیوفیلم‌ها با ۸۰ درصد از عفونت‌های میکروبی در ارتباط هستند. هم‌چنین دریافتند که رشد میکروارگانیسم‌ها در بیوفیلم‌ها می‌تواند مقاومتشان را به عوامل ضدمیکروبی افزایش دهد و با مهار فرآیند کوئوروم سنسینگ می‌توان مکانیسم تولید بیوفیلم را تحت تاثیر قرار داد (۸). در این پژوهش از عصاره شکوفه تمشک به عنوان مهارکننده QS استفاده و مشخص شد که ترکیبات این عصاره گیاهی با مهار QS، باعث جلوگیری از تشکیل بیوفیلم شد. نتایج حاصل از مطالعه مخفیان و همکاران در سال ۲۰۱۵ مشخص نمود که دو عصاره گیاهی ازمک و شوید به‌صورت معنی‌داری دارای خاصیت ضدحساسیت جمعیتی می‌باشند. به‌طوری‌که میزان این ویژگی در گیاه ازمک کمتر (۰/۳ ± ۱۲/۲۵ میلی‌متر) از گیاه شوید (۰/۵ ± ۱۳/۳ میلی‌متر) بود. هم‌چنین هر دو گیاه دارای خاصیت باکتری‌کشی نیز بودند، به‌طوری‌که میزان آن در گیاه ازمک (۰/۲ ± ۹/۵۸ میلی‌متر) بیش از گیاه شوید (۰/۲ ± ۷/۴ میلی‌متر) گزارش گردید (۳). ارزیابی میرزایی و همکاران در سال ۲۰۱۴ نشان داد که ۴۶ درصد از جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین از نظر تشکیل بیوفیلم قوی بودند. همه ایزوله‌ها دارای ژن‌های *icaD* و *icaC* بودند. در حالی که شیوع ژن‌های *icaA* و *icaB* به ترتیب ۶۰/۳ و ۵۱ درصد گزارش شد (۱۵). بر اساس تحقیقات کوآوو همکاران در سال ۲۰۱۲، عصاره 220D-F2 از ریشه تمشک (Rubus ulmifolius) می‌تواند در جلوگیری از تشکیل بیوفیلم *استافیلوکوکوس اورئوس* تا حدی که بتوان حساسیت آنتی بیوتیکی بدون اثرات سمی در سلول‌های معمولی را افزایش داد دخیل باشد. از این رو، 220D-F2 یک کاندید قوی برای توسعه به عنوان یک داروی گیاهی برای استفاده در پیشگیری و درمان عفونت بیوفیلم مربوط به *استافیلوکوکوس اورئوس* به حساب می‌آید (۱۶). هم‌چنین، در تحقیقی دیگر، کوآو و همکاران در سال ۲۰۰۸ نشان دادند که گیاهان دارویی *Lonicera alpigena, Castanea sativa ،Juglans regia ،Ballota nigra ،Rosmarinus officinalis ،Leopoldia comosa ،Cyclamen hederifolium ،Rosa canina ،Rubus ulmifolius* و *Malva sylvestris* دارای خاصیت باکتریواستاتیک بر سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین می‌باشند (۱۷). در این پژوهش از روش MTP جهت تشخیص میزان قدرت تشکیل بیوفیلم توسط جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* استفاده شد. پس از بررسی میزان OD هر کدام از چاهک‌ها، ۱۱ جدایه (۸۴/۶۱ درصد) تولیدکننده بیوفیلم قوی و ۲ جدایه (۱۵/۳۸ درصد) تولیدکننده بیوفیلم متوسط گزارش شدند. سپس، در این روش، بار دیگر عصاره شکوفه تمشک در غلظت‌های مختلف ۱۰، ۳۰ و ۵۰ میکرولیتر به چاهک‌ها اضافه گردید. نتایج حاصل نشان داد که هیچ کدام از جدایه‌ها در غلظت ۵۰ میکرولیتر عصاره شکوفه تمشک، قادر به تشکیل بیوفیلم نبودند. عصاره شکوفه تمشک با میانگین میزان جذب نوری کمتر از $OD \leq 0.08324$ باعث عدم اتصال و در نهایت عدم تولید بیوفیلم در همه‌ی جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* شد. شایان ذکر است که مولکول‌های مهارکننده سیگنال حساسیت جمعیتی در شکوفه تمشک، هنوز مشخص نیست و می‌بایست تحقیقات بیشتری در این خصوص انجام پذیرد.

۶. نتیجه‌گیری

این مطالعه نشان داد با توجه به ویژگی ضد حساسیت جمعیتی و ضد بیوفیلمی عصاره شکوفه تمشک بر جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، می‌توان با انجام مطالعات تکمیلی، از ترکیبات موجود در این گیاه جهت استفاده به عنوان دهان شویه استفاده کرد. با توجه به عدم هیدرولیز X-gal و ظهور رنگ آبی در سویه *آگروباکتریوم تومی فشنس NTL/PZLR4* ناشی از اثرات ضد حساسیت جمعیتی و هم‌چنین از بین بردن قدرت

Archive of SID

www.SID.ir

تولید بیوفیلم جدایه‌های *استافیلوکوکوس اوروئوس* با عصاره گیاهی شکوفه تمشک، می‌توان از این ترکیب گیاهی به عنوان روشی مناسب در راستای مبارزه با باکتری‌های بیماری‌زا بدون ایجاد مقاومت استفاده نمود.

۷. تقدیر و تشکر

این مطالعه بدون هرگونه حمایت مالی صورت گرفته است. نویسندگان این پژوهش از همکاری دانشگاه‌های آزاد اسلامی واحد جهرم و علوم تحقیقات کمال تشکر و سپاس‌گزاری را دارند.

۸. سهم نویسندگان

تمامی نویسندگان معیارهای استاندارد نویسندگی بر اساس پیشنهادات کمیته بین المللی ناشران مجلات پزشکی را دارا بودند.

۹. تضاد منافع

بدین‌وسیله نویسندگان تصریح می‌نمایند که هیچ‌گونه تضاد منافعی در خصوص پژوهش حاضر وجود ندارد.

Downloaded from jams.arakmu.ac.ir at 9:36 +0430 on Monday July 15th 2019

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from jams.arakmu.ac.ir at 9:36 +0430 on Monday July 15th 2019

References

1. Zeighami H, Haghi F, Naderi G. Quorum Sensing in bacterial. Quarteriy of Laboratory & Diagnosis. 2015(22):9-12.
2. Mary RNI, Banu NJIJPPS. Screening of antibiofilm and anti-quorum sensing potential of Vitex trifolia in Pseudomonas aeruginosa. 2015; 7(8):242-5.
3. Makhfian M, Hassanzadeh N, Mahmoudi E, Zandyavari NJJoEOBP. Anti-quorum Sensing Effetcs of Ethanolic Crude Extract of Anethum graveolens L. 2015; 18(3):687-96.
4. Sobhanipour A, Behboudi K, Mahmoudi E. Bioassay for interference of AHL-dependent gene regulation in Pectobacterium atrosepticum and modulation of LuxI and LuxR by N-acylhomoserine lactone degrading rhizobacteria. 2017; 6(1):11-21.
5. Dhir SJJoISoP. Biofilm and dental implant: The microbial link. 2013; 17(1):5.
6. Fetzner SJJob. Quorum quenching enzymes. 2015; 201:2-14.
7. Brackman G, Coenye TJCpd. Quorum sensing inhibitors as anti-biofilm agents. 2015; 21(1):5-11.
8. Mahmoudi E. Anti-quorum sensing activity in plant extracts and its effect on the virulence of Pectobacterium carotovorum. . Biocontrol in plant protection. 2017; 5(1):59-70.
9. Soorani F. Herbs and their necessity in the development of the health system. Selected Works and Selected Articles of the 9th Pioneering Congress of Progress. 2016: 967-74.
10. Ahmed AT, Latef SA, Aziz IHJJouoAfPs. Molecular Detection of fnbA, fnbB and nuc Genes and Phenotypic Detection of some Virulence Factors in Local Staphylococcus aureus Isolates. 2017; 11(3):8-16.
11. Adonizio AL. Anti-quorum sensing agents from South Florida medicinal plants and their attenuation of Pseudomonas aeruginosa pathogenicity. 2008.
12. Rahman M, Amin K, Rahman S, Khair A, Rahman M, Hossain A, et al. Investigation of methicillin-resistant Staphylococcus aureus among clinical isolates from humans and animals by culture methods and multiplex PCR. 2018; 14(1):300.
13. Goudarzi M, Mehrabi M, Mirzaee MJsjoiuoms. A Study on the Prevalence of IS256 Insertion Sequence and Biofilm Formation in Staphylococcus Epidermidis Isolated from Healthy Human Skin. 2018; 26(1):85-93.
14. Madani SB, Amini K. Phenotypic and genotypic study of Staphylococcus aureus biofilm genes isolated from clinical and food cases using microtitrplate and Multiplex PCR. 2018.
15. Mirzaee M, Najar Peerayeh S, Ghasemian A-MJIJoP. Detection of icaABCD genes and biofilm formation in clinical isolates of methicillin resistant Staphylococcus aureus. 2014; 9(4):257-62.
16. Quave CL, Estévez-Carmona M, Compadre CM, Hobby G, Hendrickson H, Beenken KE, et al. Ellagic acid derivatives from Rubus ulmifolius inhibit Staphylococcus aureus biofilm formation and improve response to antibiotics. 2012; 7(1):e28737.
17. Quave CL, Plano LR, Pantuso T, Bennett BCJJoe. Effects of extracts from Italian medicinal plants on planktonic growth, biofilm formation and adherence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. 2008; 118(3):418-28.

Archive of SID

www.SID.ir