Archive of SID

تحقیقی

اثر عصاره متانولی بولاغ اوتی (*Nasturtium officinale*) بر رشد و تشکیل بیوفیلم پسودوموناس آئروژینوزا

آرین امیدی[۱]، دکتر اصغر شریفی*[۲]

۱- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد یاسوج، دانشگاه آزاد اسلامی، یاسوج، ایران.

۲- دانشیار، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران.

چکیده

زمینه و هدف : *بیوفیلم ناشی از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا نقش مهمی علیه سلامت انسان بازی کرده و به‌دلیل مقاومت آنها در برابر مواد شوینده و عوامل ضدمیکروبی به سختی به درمان پاسخ می‌دهند. در مطالعاتی اثر ضدمیکروبی گیاه بولاغ اوتی (Nasturtium officinale) مشخص شده است. این مطالعه به منظور تعیین اثر عصاره متانولی گیاه بولاغ اوتی بر رشد و تشکیل بیوفیلم پسودوموناس آئروژینوزا انجام شد.*

روش بررسی : *در این مطالعه توصیفی- تحلیلی عصاره‌گیری گیاه بولاغ اوتی با روش خیساندن در متانول ۸۰ درصد، به‌وسیله دستگاه روتاری اواپراتور انجام شد. حداقل غلظت مهار کنندگی عصاره بولاغ اوتی علیه پسودوموناس آئروژینوزا با روش میکرودایلوشن براث تعیین شد. تشکیل بیوفیلم با روش میکروتیتر پلیت و رنگ‌آمیزی با کریستال ویوله بررسی گردید.*

یافته ها : *حداقل غلظت مهار کنندگی عصاره متانولی بولاغ اوتی علیه پسودوموناس آئروژینوزا ۰/٦۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و حداقل غلظت کشندگی این عصاره ۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. سویه PAO1 و ۵ سویه بالینی، قادر به تشکیل بیوفیلم بودند. مهار تشکیل بیوفیلم توسط عصاره گیاه بولاغ اوتی به غلظت وابسته بود. بیشترین درصد مهار تشکیل بیوفیلم در غلظت ۷/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و کمترین درصد مهار تشکیل بیوفیلم در غلظت ۰/۱۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. میانگین مهار تشکیل بیوفیلم پسودوموناس آئروژینوزا توسط عصاره بولاغ اوتی ۲۲/۲۷ ±۷۲/٦۹ درصد به‌دست آمد. در غلظت‌های ۷/۵، ۰/۹۳، ۰/٤٦، ۰/۲۳ و ۰/۱۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اختلاف معنی‌داری بین سویه‌های بالینی و سویه PAO1 مشاهده شد (P<۰/۰۵).*

نتیجه‌گیری : *عصاره متانولی گیاه بولاغ اوتی دارای اثر ضد باکتریایی و ضد بیوفیلمی علیه پسودوموناس آئروژینوزا بود.*

کلید واژه‌ها : *گیاه بولاغ اوتی ، پسودوموناس آئروژینوزا ، بیوفیلم ، حداقل غلظت مهار کنندگی*

* نویسنده مسؤول : دکتر اصغر شریفی ، پست الکترونیکی asgharsharifi@yahoo.com

نشانی : یاسوج، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، دانشکده پزشکی، تلفن ۳۱-۳۳۳۳۷۲۳۰-۰۷٤ ، نمابر ۳۳۳۳۷۲۳۰

وصول مقاله : ۱۳۹٦/۲/۱۹ ، اصلاح نهایی : ۱۳۹٦/٤/۱٤ ، پذیرش مقاله : ۱۳۹٦/۵/۳۱

آرین امیدی https://orcid.org/0000-0002-6824-3776؛ دکتر اصغر شریفی https://orcid.org/0000-0001-7856-0313

مقدمه

جنس پسودوموناس بیش از ۱۲۰ گونه است و در همه جا از جمله محیط‌های مرطوب وجود دارد (۱). پسودوموناس آئروژینوزا یک پاتوژن انسانی فرصت طلب است که می‌تواند در محیط‌های متنوع طبیعی و بیمارستانی رشد کند. عفونت پسودوموناس آئروژینوزا در افراد سالم نادر است؛ اما در افراد در معرض خطر مانند بیماران مبتلا به فیبروز کیستیک، سوختگی‌های شدید و یا بیماران با اختلال در سیستم ایمنی نظیر بیماران مبتلا به HIV و در بیماران مبتلا به سرطان تحت شیمی‌درمانی عفونت پسودوموناس آئروژینوزا دیده می‌شود (۲).

پسودوموناس آئروژینوزا یک پاتوژن فرصت‌طلب است که در برابر بسیاری از ضدعفونی‌کننده‌ها وآنتی‌بیوتیک‌ها ازجمله پنی‌سیلین‌های ضدپسودوموناس، سفتازیدیم، کاربا‌پنیم‌ها، آمینوگلیکوزیدها و سیپروفلوکساسین مقاوم است (۳). یک تغییر به حالت بیوفیلم باعث افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی و ایجاد یک عفونت شدید و قابل توجه در ریه بیماران دارای سیستیک فیبروزیس می‌شود (۴). موفقیت پسودوموناس آئروژینوزا به عنوان یک پاتوژن فرصت‌طلب به علت تطبیق‌پذیری و سازگاری و تنوع است که به‌وسیله ژنوم کدگذاری شده است. ژنوم باکتری پسودوموناس آئروژینوزا در مقایسه با سایر باکتری‌های بیماری‌زا بزرگ‌تر است. برای سویه استاندارد PA01 پسودوموناس آئروژینوزا تعداد ۵۲۱ ژن بیماری‌زا و ۱۶۸ بیماری پیش‌بینی شده است (۵).

Downloaded from goums.ac.ir at 11:04 +0430 on Sunday July 8th 2018

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from goums.ac.ir at 11:04 +0430 on Sunday July 8th 2018

پسودوموناس آئروژینوزا به‌دلیل نفوذپذیری کم در غشای خارجی که به عنوان یک سد انتخابی عمل می‌کند؛ باعث مقاومت ذاتی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف می‌شود. به‌طوری که ظهور مقاومت به آنتی‌بیوتیک در بیماران فیبروزکیستیک گزارش شده است (۱). مکانیسم‌های مقاومت در پسودوموناس آئروژینوزا شامل پمپ‌های جریان، نفوذپذیری غشای خارجی، بتالاکتاماز، جهش، انتقال افقی و تغییرات غشایی است (۱و۵).

در طبیعت باکتری‌ها به دونوع فرم پلانکتونیک و بیوفیلم مشاهده می‌شوند. بیوفیلم اجتماع پیچیده باکتری است که در یک پوشش گلیکوکالیکس احاطه شده و به سطوح مخاطی متصل می‌شود. تشکیل بیوفیلم توسط پسودوموناس آئروژینوزا در راه تنفسی بیماران فیبروز کیستیک، پنومونی و بیماران ریوی مزمن یکی از علت‌های مهم در طولانی شدن درمان، تشدید علایم بالینی و حتی مرگ بیماران است (۶). همچنین تشکیل بیوفیلم یک حالت محافظ رشد میکروارگانیسم است که اجازه می‌دهد میکروارگانیسم در میزبان و محیط زنده بماند. بیوفیلم می‌تواند بر روی انواع سطوح تشکیل شود و در محیط‌های طبیعی، صنعتی و بیمارستان رایج است (۷). توانایی باکتری در چسبیدن به مواد طبیعی و مصنوعی اولین گام در تشکیل بیوفیلم است (۸). تشکیل بیوفیلم یک روند بسیار سریع است که همواره چندین مرحله را شامل می شود و مشارکت فعال سلول‌های میکروبی برای چسبیدن ضروری است. تولید مواد پلیمری خارج سلولی (extracellular polymeric substances: EPS)از اهمیت قابل توجهی برای تشکیل بیوفیلم برخوردار است و ساختارهای سطحی مانند پیلی و فلاژلا در این کار نقش دارند (۹). بیوفیلم ناشی از میکروارگانیسم‌های بیماری زا نقش مهمی را در سلامت انسان بازی می‌کند و به دلیل مقاومت آنها در برابر مواد شوینده و عوامل ضد میکروبی به سختی به درمان پاسخ می‌دهند. براساس تخمین مؤسسه ملی بهداشت، بیوفیلم بیش از ۶۵ درصد عفونت‌های بیمارستانی و تا ۷۵ درصد عفونت‌های میکروبی در بدن انسان را شامل می‌شود. بیوفیلم ناشی از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا بر روی ابزار پزشکی و ایمپلنت مانند کاتتر، دریچه‌های مصنوعی قلب، لنزهای تماسی و مفاصل مصنوعی نیز تشکیل می‌شود (۱۰).

از سوی دیگر افزایش بی‌رویه در استفاده از آنتی بیوتیک‌ها در مراکز بهداشتی درمانی و یا به‌وسیله افرادی که خودسرانه دارو تجویز می‌کنند؛ می‌تواند مستعد بیماری‌های عفونی به‌وسیله میکروارگانیسم‌های مقاوم به چنددارو شود. در این میان شناسایی و ارزیابی ترکیبات ضدمیکروبی موجود در عصاره گیاهان دارویی به عنوان یک منبع جدید دارویی و یک روش درمان جایگزین یک راه‌حل برای این چالش است (۱۱).

گیاه بولاغ اوتی با نام علمی *Nasturtium officinale*، از تیره شب بو و خانواده Brassicacea است و به علف چشمه معروف است. گیاه بولاغ اوتی دارای ترکیبات گلوکوناستورتین و ویتامین‌های A ، C و E و نیز دارای فلاوونوئیدهای مهمی از جمله لوتئین و کوئرستین است. گیاه بولاغ اوتی در کاهش قندخون بالا، چربی خون بالا، فشارخون بالا و بیماری‌های قلبی عروقی و ریوی مؤثر است (۱۲). گیاه بولاغ اوتی در نواحی مختلفی مانند کرج، آذربایجان، گیلان، کهگیلویه و بویر احمد، سیستان و بلوچستان، بوشهر و فارس می‌روید. این گیاه دارای بتاکاروتن، اسید اسکوربیک، کلسیم، اسید فولیک، آهن، فسفر، ید و اسیدهای آمینه بوده و در مهار رشد سلول‌های سرطانی ریه مؤثر است. گیاه بولاغ اوتی به خاطر مدر بودن در بیماری‌های کلیه و مجاری ادرار مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۳). گیاه بولاغ اوتی توسط مردم روستایی برای تغذیه، ضدالتهاب و آنتی‌اکسیدان استفاده می‌شود و یک سبزی است که به صورت خام یا پخته در سالاد، سوپ و سایر غذاهای اروپایی و ترکی و همچنین برای درمان درد شکم در طب سنتی استفاده می‌شود (۱۴). در مطالعات انجام شده نیز اثر ضدمیکروبی گیاه بولاغ اوتی ثابت شده است (۱۴و۱۵). این مطالعه به منظور تعیین اثر عصاره متانولی بولاغ اوتی بر رشد و تشکیل بیوفیلم پسودوموناس آئروژینوزا انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه توصیفی - تحلیلی در آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج در سال ۱۳۹۵ انجام شد.

برای نمونه‌گیری ابتدا با مراجعه به آزمایشگاه‌های شهر یاسوج، تعداد ۱۰ نمونه بالینی پسودوموناس آئروژینوزا جمع‌آوری و در حداقل زمان ممکن به آزمایشگاه میکروب‌شناسی انتقال داده شد. علاوه بر نمونه‌های بالینی از نمونه استاندارد PAO1 پسودوموناس آئروژینوزا استفاده شد.

برای تأیید مجدد سویه‌ها از تست‌های بیوشیمیایی از جمله تست اکسیداز، کاتالاز، Oxidative Fermentative، تولید پیگمان و رنگ‌آمیزی گرم استفاده شد.

گیاه بولاغ اوتی در یکی از چشمه‌های آب شهر یاسوج جمع‌آوری و در مرکز تحقیقات گیاه شناسی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج شناسایی شد.

گیاه در دمای اتاق و دور از نور و رطوبت خشک گردید. برای تهیه عصاره متانولی گیاه بولاغ اوتی ابتدا گیاه خشک شده آسیاب شد. سپس برای تهیه عصاره متانولی ۸۰ درصد، مقدار ۲۰۰ گرم از گیاه پودر شده در ۱۰۰۰ سی‌سی متانول ۸۰ درصد ریخته شد و با روش خیساندن مخلوط گردید. سپس به مدت ۴۸ ساعت بر روی شیکر در دمای اتاق قرار داده شد. در نهایت به‌وسیله دستگاه پمپ خلاء و دستگاه Rotary evaporator عصاره‌گیری انجام شد و عصاره به‌دست آمده پس از خشک شدن در یخچال نگهداری شد

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from goums.ac.ir at 11:04 +0430 on Sunday July 8th 2018

(۱۶). برای تهیه غلظت مورد نیاز از عصاره گیاه بولاغ اوتی به منظور تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (Minimum Inhibitory Concentration: MIC)، مقدار ۰/۰۲ گرم از عصاره به‌وسیله ترازو وزن شد و سپس در یک‌سی‌سی از دی متیل سولفوکساید حل و با استفاده از فیلتر میلی‌پور ۰/۲۲ میکرون استریل شد و به عنوان محلول ذخیره (۲۰میلی گرم بر میلی‌لیتر) تا زمان مصرف در ظرف شیشه‌ای استریل و تیره در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۱۶). برای تهیه غلظت مورد نیاز از عصاره برای بررسی مهار بیوفیلم، ابتدا مقدار ۰/۰۳ گرم از عصاره به‌وسیله ترازو وزن شد و در یک سی سی از دی‌متیل سولفوکساید حل و با استفاده از فیلتر میلی‌پور ۰/۲۲ میکرون استریل شد و به عنوان محلول ذخیره (۳۰ میلی گرم بر میلی‌لیتر) تا زمان مصرف در ظرف شیشه‌ای استریل و تیره در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۱۶). برای تعیین MIC از روش میکرودایلوشن براث استفاده گردید (۱۶و۱۷). به این ترتیب که ابتدا در هر کدام از چاهک‌های پلیت ۹۶ چاهکی مقدار ۹۵ میکرولیتر محیط کشت مولر هینتون براث ریخته شد. در ردیف‌های کنترل منفی (بلانک) ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت ریخته شد. سپس در تمام چاهک‌های ستون اول ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره تهیه شده (در سه تکرار) اضافه شد. بعد از این مرحله محتویات اولین چاهک ردیف اول با سمپلر به‌خوبی مخلوط شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از آن با سمپلر به چاهک بعدی انتقال داده شد. این کار تا یک چاهک مانده به آخر به همین ترتیب انجام شد و ۱۰۰ میکرولیتر آخر دور ریخته شد. بنابراین چاهک آخر (کنترل مثبت) فاقد عصاره بود. ردیف‌های بعدی هم به همین ترتیب انجام شد. غلظت عصاره‌ها در چاهک‌ها به ترتیب ۱۰، ۵، ۲/۵، ۱/۲۵، ۰/۶۲۵، ۰/۳۱۲ و ۰/۱۵۶ میلی گرم بر میلی‌لیتر بود. در مرحله بعد سوسپانسیون میکروبی معادل نیم مک فارلند به رقت 1×10^{7} CFU/ML رسانده شد و در تمام چاهک‌ها به‌جز چاهک‌های بلانک (کنترل منفی)، مقدار ۵ میکرولیتر از سوسپانسون باکتری با رقت 1×10^{7} CFU/ML ریخته شد که در نهایت غلظت باکتری هر چاهک 5×10^{5} CFU/ML شد. در مرحله بعد پلیت ۹۶ چاهکی به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در آنکوباتور شیکردار قرار گرفت. بعد از این مدت زمان، اولین چاهکی که رشد باکتری را مهار کرده بود؛ به عنوان MIC در نظر گرفته شد. برای تعیین حداقل غلظت کشندگی (Minimum Bactericidal Concentration: MBC) مقدار ۱۰ میکرولیتر از محتویات هر کدام از چاهک‌ها (چاهک MIC و دو چاهک قبل و دو چاهک بعد از چاهک MIC) برداشته شد و بر روی محیط نوترینت آگار (در سه تکرار) کشت داده شد و به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در آنکوباتور قرار گرفت. بعد از این مدت کمترین غلظت از عصاره که مانع رشد باکتری شده بود؛ به عنوان MBCدر نظر گرفته شد (۱۶و۱۸و۱۹).

برای بررسی اثر عصاره متانولی این گیاه بر روی تشکیل بیوفیلم پسودوموناس آئروژینوزا از روش میکروتیتر پلیت و رنگ‌آمیزی با کریستال ویوله ۰/۱ درصد استفاده شد (۱۶و۲۰). برای این کار ابتدا در هر کدام از چاهک‌های پلیت ۹۶ چاهکی مقدار ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت مولر هینتون براث ریخته شد و در تمام چاهک‌های ستون اول به‌جز چاهک‌های کنترل منفی مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره آماده شده با غلظت اولیه ۳۰ میلی گرم بر میلی‌لیتر (در سه تکرار) اضافه شد و همانند روش MIC ، عصاره به چاهک‌های بعدی منتقل شد. با این تفاوت که حجم نهایی چاهک‌ها در روش بررسی MIC برابر با ۱۰۰ میکرولیتر بود؛ اما برای بررسی بیوفیلم حجم نهایی هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر بود. در مرحله بعد ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسون رقیق شده باکتری با رقت 2×10^{6} CFU/ML به تمام چاهک ها (بجز چاهک های کنترل منفی) اضافه شد. به‌طوری که در نهایت غلظت باکتری هر چاهک معادل 10^{6} CFU/ML بود. بنابراین چاهک‌های کنترل مثبت شامل ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت و ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری بود و هیچگونه عصاره‌ای در آنها وجود نداشت. در چاهک‌های کنترل منفی فقط ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت ریخته شد و چاهک‌های تیمار شامل محیط کشت، عصاره و باکتری بودند. پلیت ۹۶ چاهکی به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در آنکوباتور بدون شیکر قرار گرفت. بعد از ۲۴ ساعت محتویات چاهک‌ها به آرامی و با برگرداندن پلیت ۹۶ چاهکی خالی شد و سه مرتبه با سدیم کلرید ۹ درصد شستشو داده شد. سپس میکروتیتر پلیت در دمای اتاق خشک گردید و به هر کدام از چاهک‌ها ۲۰۰ میکرولیتر متانول اضافه شد تا جمعیت بیوفیلمی تثبیت شود. بعد از ۱۵ دقیقه متانول چاهک‌ها دور ریخته شد و پلیت ۹۶ چاهکی در دمای اتاق خشک گردید. سپس به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر کریستال ویوله ۰/۱ درصد به مدت ۵ دقیقه اضافه شد و بعد از این مدت زمان رنگ‌های اضافی با جریان ملایم آب شسته شد و پلیت ۹۶ چاهکی در دمای اتاق خشک گردید. در مرحله بعد به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر اسید استیک گلاسیال ۳۳ درصد اضافه شد و رنگ‌های متصل به چاهک در اسید حل گردید. سپس توسط دستگاه الایزا ریدر میزان جذب نوری در ۶۳۰ نانومتر خوانده شد.

سنجش درصد کاهش تولید بیوفیلم پسودوموناس آئروژینوزا بر اساس فرمول زیر محاسبه شد (۱۶و۲۰).

$$\{[(ODC-ODB)-(ODT-ODB)] / (ODC-ODB)\} \times 100$$

ODC : جذب نوری چاهک کنترل مثبت
ODB : جذب نوری چاهک بلانک (کنترل منفی)
ODT : جذب نوری چاهک تیمار با عصاره گیاه بولاغ اوتی

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from goums.ac.ir at 11:04 +0430 on Sunday July 8th 2018

جدول ۱ : میزان حداقل غلظت مهار کنندگی و حداقل غلظت کشندگی عصاره متانولی گیاه بولاغ اوتی علیه سویه‌های بالینی و استاندارد پسودوموناس آئروژینوزا

سویه‌ها	حداقل غلظت مهار کنندگی (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	حداقل غلظت کشندگی (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)
استاندارد	۰/۶۲۵	۱/۲۵
۱بالینی	۱/۲۵	۱/۲۵
۲ بالینی	۰/۶۲۵	۲/۵
۳ بالینی	۱/۲۵	۲/۵
٤ بالینی	۰/۶۲۵	۱/۲۵
۵ بالینی	۰/۶۲۵	۲/۵
٦ بالینی	۰/۶۲۵	۲/۵
۷ بالینی	۱/۲۵	۲/۵
۸ بالینی	۲/۵	۲/۵
۹ بالینی	۲/۵	۵
۱۰ بالینی	۱/۲۵	۲/۵

جدول ۲ : درصد مهار تشکیل بیوفیلم سویه‌های پسودوموناس آئروژینوزا توسط عصاره متانولی گیاه بولاغ اوتی

سویه‌ها	غلظت (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) ۷/۵	۳/۷۵	۱/۸۷	۰/۹۳	۰/٤٦	۰/۲۳	۰/۱۱
استاندارد	۱۰۰	۹۳	۹۰/٦	۳۹/۵	۲٤/٤	۲٤/٤	۲۲
۲بالینی	۹٦/۵	۹٤/٦	۹٤	۹۲/۷	٦٦/۹	٦۳/۹	۵۵/٦
۵ بالینی	۹٦/٤	۹٦/۱	۹۵/۲	۹۳/۳	٦۱/۱	۵٤/۱	٤٤/۵
۷ بالینی	۹۵/۸	۹٤/٤	۹۲/۵	۷۳/۹	۷۰/٦	٦۰/٤	۵۱/۱
۸ بالینی	۹۸/۱	۹۰/۸	۷۹/۸	۷۸/۸	۷٦/۱	۷٤/۳	٦۵/۱
۱۰بالینی	۹۳/۲	٦۹/٦	٦۷/٤	٦۲/۹	۵۸/٤	۵۱/٦	٤۹/٤
میانگین	۹٦/٦٦± ۲/۲	۸۹/۷۵± ۱۰	۸٦/۵۸± ۱۰/۹	۷۳/۵۱± ۲۰/۲	۵۹/۵۸± ۱۸/۳	۵٤/۷۸± ۱٦/۹	٤۷/۹۵± ۱٤/٤

سویه‌هایی که بیوفیلم تشکیل ندادند یا تشکیل بیوفیلم آنها ضعیف بود؛ از این آزمون حذف شدند.

در این مطالعه همه آزمون‌ها با سه تکرار انجام شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS-21 و آزمون تحلیل واریانس، آزمون دانکن و T-Test تک نمونه‌ای در سطح معنی داری کمتر از ۰/۰۵ تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

عصاره گیاه بولاغ اوتی دارای اثر مهارکنندگی و اثر کشندگی علیه سویه‌های بالینی و سویه استاندارد PAO1 پسودوموناس آئروژینوزا بود. حداقل غلظت مهار کنندگی عصاره بولاغ اوتی علیه پسودوموناس آئروژینوزا ۰/۶۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و حداقل غلظت کشندگی این عصاره علیه پسودوموناس آئروژینوزا ۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌دست آمد (جدول یک).

نتایج بررسی تشکیل بیوفیلم سویه‌های بالینی و سویه استاندارد پسودوموناس آئروژینوزا نشان داد که تعداد ۵ سویه بالینی از میان ۱۰ سویه بالینی مورد بررسی و همچنین سویه استاندارد PAO1 پسودوموناس آئروژینوزا با روش میکروتیتر پلیت و رنگ‌آمیزی با کریستال ویوله قادر به تشکیل بیوفیلم بودند. اثر عصاره گیاه بولاغ اوتی بر روی این سویه‌ها که قادر به تشکیل بیوفیلم بودند؛ نشان داد که عصاره متانولی بولاغ اوتی علاوه بر اثر ضدباکتریایی علیه پسودوموناس آئروژینوزا دارای اثر ضدبیوفیلمی علیه این باکتری نیز هست. عصاره متانولی گیاه بولاغ اوتی به‌طور میانگین ۲۲/۲۷±۷۲/۶۹ درصد تشکیل بیوفیلم سویه‌های بالینی و سویه استاندارد PAO1 پسودوموناس آئروژینوزا را مهار نمود. درصد مهار تشکیل بیوفیلم پسودوموناس آئروژینوزا توسط عصاره گیاه بولاغ اوتی به غلظت وابسته بود. به‌طوری که بیشترین درصد مهار تشکیل بیوفیلم در غلظت ۷/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و کمترین درصد مهار تشکیل بیوفیلم در غلظت ۰/۱۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تعیین شد. در یک مقایسه کلی بین تمام غلظت‌های عصاره متانولی بولاغ اوتی علیه سویه‌های بالینی و سویه استاندارد PAO1 پسودوموناس آئروژینوزا، اختلاف آماری معنی‌داری بین سویه‌های بالینی و سویه استاندارد PAO1 پسودوموناس آئروژینوزا یافت نشد؛ اما مقایسه سویه‌های بالینی و سویه استاندارد PAO1 پسودوموناس آئروژینوزا در هر غلظت جداگانه تک نمونه‌ای اختلاف آماری معنی‌داری را در غلظت‌های ۷/۵، ۰/۹۳، ۰/۴۶، ۰/۲۳ و ۰/۱۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بین سویه‌های بالینی و سویه استاندارد PAO1 نشان داد (P<۰/۰۵).

نتایج درصد مهار تشکیل بیوفیلم سویه‌های پسودوموناس آئروژینوزا توسط عصاره متانولی بولاغ اوتی در جدول ۲ آمده است.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from goums.ac.ir at 11:04 +0430 on Sunday July 8th 2018

بحث

با توجه به نتایج این مطالعه عصاره متانولی گیاه بولاغ اوتی دارای اثر مهارکنندگی رشد، اثر کشندگی و اثر مهار کنندگی بیوفیلم علیه سویه‌های پسودوموناس آئروژینوزا بود. درصد کاهش مهار بیوفیلم سویه‌های پسودوموناس آئروژینوزا توسط عصاره متانولی گیاه بولاغ اوتی به غلظت عصاره وابسته بود. به‌طوری که بیشترین درصد مهار تشکیل بیوفیلم در غلظت ۷/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و کمترین درصد مهار تشکیل بیوفیلم در غلظت ۰/۱۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تعیین شد.

مطالعات قبلی نیز تأیید کننده خواص ضدباکتریایی این گیاه است. به عنوان مثال در مطالعه Penecilla و Magno که روی فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌های ۱۲ گیاه دارویی رایج در فیلیپین انجام شد؛ مشخص گردید که عصاره‌های n-Hexane، استون، اتانولی و آبی گیاه بولاغ اوتی اثر ضد باکتریایی علیه پسودوموناس آئروژینوزا دارند (۱۵). در مطالعه حاضر نیز عصاره متانولی گیاه بولاغ اوتی دارای اثر ضدباکتریایی علیه پسودوموناس آئروژینوزا بود.

در مطالعه Freitas و همکاران فعالیت ضدباکتریایی و اثر هم‌افزایی بین عصاره بولاغ اوتی و ۲- فنتانیل ایزوتیوسیانات و آنتی‌بیوتیک در برابر یازده سویه از باکتری اشریشیاکلی از منابع انسانی حیوانی مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد در صورتی که آنتی‌بیوتیک با عصاره گیاه بولاغ اوتی ترکیب شود؛ فعالیت ضدمیکروبی آنتی‌بیوتیک افزایش می‌یابد (۲۱).

در مطالعه نیکان و خاوری که روی فعالیت ضدقارچی عصاره بولاغ اوتی علیه قارچ عامل پوسیدگی سیب زمینی انجام شد؛ مشخص گردید در میان غلظت‌های مختلف عصاره بولاغ اوتی، بالاترین هاله عدم رشد قارچ ۲۶/۱ میلی‌متر است. همچنین نرخ مهار رشد به غلظت وابسته بود. به طوری که عصاره الکلی بولاغ اوتی توانست رشد میسلیوم قارچ (*Fusarium solani*) را بر اساس وابسته بودن به دوز مهار کند (۱۴). در مطالعه حاضر نیز عصاره متاولی بولاغ اوتی علیه پسودوموناس آئروژینوزا اثر بازدارندگی رشد و اثر کشندگی داشت. علاوه بر این مهار تشکیل بیوفیلم پسودوموناس آئروژینوزا به غلظت عصاره وابسته بود.

در مطالعه Abdul و همکاران فعالیت آنتی‌اکسیدانی، محتوای فنلی و فعالیت ضدمیکروبی گیاه بولاغ اوتی بررسی شد. عصاره متانولی بولاغ اوتی علیه باکتری‌ها (B.PU, E.coli, S.au, B.Ce, KLb, E.NT, B.sub, St.Ep, PS) و قارچ‌ها (Can, Sac) دارای اثر ضدمیکروبی بود (۲۲). مطالعه حاضر نیز نشان داد که عصاره متانولی بولاغ اوتی دارای اثر ضدمیکروبی علیه پسودوموناس آئروژینوزا است.

در رابطه با اثر عصاره گیاه بولاغ اوتی بر روی تشکیل بیوفیلم پسودوموناس آئروژینوزا و سایر میکروب‌ها مطالعه‌ای یافت نشد.

با توجه به این که در مطالعه حاضر اثر بازدارندگی رشد، اثر کشندگی و اثر ضد بیوفیلمی عصاره متانولی گیاه بولاغ اوتی علیه پسودوموناس آئروژینوزا مشخص شد و همچنین سایر مطالعات انجام شده در گذشته تایید کننده اثر ضدمیکروبی عصاره بولاغ اوتی هستند؛ احتمالاً در آینده با مطالعات بیشتر بر روی ترکیبات این عصاره و بررسی اثر ضدمیکروبی و ضدبیوفیلمی آن بر روی سایر میکروب‌ها می توان از این عصاره به عنوان مکمل درمانی در کنار آنتی‌بیوتیک‌ها برای مقابله با مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی و مهار بیوفیلم استفاده کرد. پیشنهاد می شود اثر عصاره متانولی گیاه بولاغ اوتی روی رشد و تشکیل بیوفیلم سایر باکتری‌ها و قارچ‌ها و همچنین بر روی بیان ژن‌های مرتبط با تشکیل بیوفیلم پسودوموناس آئروژینوزا و سایر میکروب‌ها بررسی شود. با توجه به این که مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک‌ها روز به روز در حال افزایش است و تشکیل بیوفیلم توسط پسودوموناس آئروژینوزا مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها را افزایش می‌دهد؛ احتمالاً در آینده با مطالعات بیشتر بر روی عصاره گیاه بولاغ اوتی بتوان از آن به‌عنوان مکمل درمانی همراه آنتی‌بیوتیک ها استفاده نمود.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره متانولی گیاه بولاغ اوتی در شرایط آزمایشگاهی علاوه بر اثر ضدباکتریایی، دارای اثر ضدبیوفیلمی علیه پسودوموناس آئروژینوزا است و این عصاره تشکیل بیوفیلم سویه‌های بالینی و سویه استاندارد PAO1 پسودوموناس آئروژینوزا را براساس وابسته بودن به غلظت مهار کرد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه حاصل پایان‌نامه (کد ۱۲۰۳۰۵۰۷۹۴۲۰۰۸) آقای آرین امیدی برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته میکروبیولوژی از دانشگاه آزاد اسلامی واحد یاسوج بود. بدین‌وسیله از دانشگاه آزاد اسلامی واحد یاسوج، دانشکده پزشکی یاسوج، کارشناسان آزمایشگاه میکروب‌شناسی خانم راضیه محسنی و خانم مرضیه طاهری‌پور تشکر و قدردانی می‌شود.

References

1. Streeter K, Katouli M. Pseudomonas aeruginosa: A review of their Pathogenesis and Prevalence in Clinical Settings and the Environment. Infection Epidemiology and Microbiology. 2016; 2 (1) :25-32.

2. Karatuna O, Yagci A. Analysis of quorum sensing-dependent virulence factor production and its relationship with antimicrobial susceptibility in Pseudomonas aeruginosa respiratory isolates. Clin Microbiol Infect. 2010 Dec; 16(12): 1770-5. doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.03177.x

3. Shaikh S, Fatima J, Shakil S, Rizvi SM, Kamal MA. Prevalence of multidrug resistant and extended spectrum beta-lactamase producing Pseudomonas aeruginosa in a tertiary care hospital. Saudi J Biol Sci. 2015; 22(1): 62-64.

4. Adonizio A, Kong K.F, Mathee K. Inhibition of quorum

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from goums.ac.ir at 11:04 +0430 on Sunday July 8th 2018

sensing-controlled virulence factuor production in Pseudomonas aeruginosa by South Florida plant extracts. Antimicrob Agents Chemother. 2008; 52(1): 198-203.

5. Gellatly SL, Hancock RE. Pseudomonas aeruginosa: new insights into pathogenesis and host defenses. Pathog Dis. 2013 Apr; 67(3): 159-73. doi: 10.1111/2049-632X.12033

6. Ghotaslou R, Salahi Eshlaqghi B. [Biofilm of Pseudomonas aeruginosa and new preventive measures and anti-biofilm agents]. J Rafsanjan Univ Med Sci. 2013; 12(9): 747-68. [Article in Persian]

7. Wei Q, Ma LZ. Biofilm matrix and its regulation in Pseudomonas aeruginosa. Int J Mol Sci. 2013 Oct; 14(10): 20983-1005. doi: 10.3390/ijms141020983

8. Ruhal R, Antti H, Rzhepishevska O, Boulanger N, Barbero DR, Wai SN, et al. A multivariate approach to correlate bacterial surface properties to biofilm formation by lipopolysaccharide mutants of Pseudomonas aeruginosa. Colloids Surf B Biointerfaces. 2015 Mar; 127: 182-91. doi: 10.1016/j.colsurfb.2015.01.030

9. Masák J, Čejková A, Schreiberová O, Rezanka T. Pseudomonas biofilms: possibilities of their control. FEMS Microbiol Ecol. 2014 Jul; 89(1): 1-14. doi: 10.1111/1574-6941.12344

10. Pratiwi SUT, Lagendijk EL, Hertiani T, Weert Sd, Hondel CAMJJVD. Antimicrobial effects of indonesian medicinal plants extracts on planktonic and biofilm growth of Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus. J Horticulture. 2015; 2: 119. doi:10.4172/2376-0354.1000119

11. Ulloa-Urizar G, Aguilar-Luis MA, De Lama-Odría MD, Camarena-Lizarzaburu J, del Valle Mendoza J. Antibacterial activity of five Peruvian medicinal plants against Pseudomonas aeruginosa. Asian Pac J Trop Biomed. 2015; 5(11): 928-31. doi: https://doi.org/10.1016/j.apjtb. 2015.07.016

12. Zargari F, Ghorbanihaghjo A, Babaei H, Farajnia S, Hayati Roodbari N. [The effect of hydroalcoholic extract of Nasturtium officinale R.Br on antioxidant status and DNA damage in liver and kidney rats exposed to arsenic]. Med J Tabriz Univ Med Sci. 2014; 3(36): 44-51. [Article in Persian]

13. Mohammadi J, Safari F, Rad P, Delaviz H. [The effect of Hydroalcoholic extract of Nasturtium officinalis on ovarian hormonal and histological changes after toxicity by doxorubicin in rats]. J RafsanjanUniv Med Sci. 2016; 14(11): 953-64. [Article in Persian]

14. Nikan J, Khavari H. In vitro anti-fungal activity of watercress (Nasturtium officinale) extract against Fusarium solani, the causal agent of potato dry rot. Journal of Herbal Drugs. 2014; 5(1): 19-24.

15. Penecilla GL, Magno CP. Antibacterial activity of extracts of twelve common medicinal plants from the Philippines. J Med Plants Res. 2011; 5(16): 3975-81.

16. Omidi A, Sharifi A. [The effect of methanolic extracts of plants Quercus brantii, Pistacia atlantica and Elaeagnus angustifolia on Biofilm formation of Pseudomonas aeruginosa]. Armaghan-e-Danesh. 2017; 21(10): 999-1012. [Article in Persian]

17. Bokaeian M, Farazmand R, Kyghobadi S, Saeidi S. [The antimicrobial activity of extract of Allium Sativum against Staphylococcus aureus resistant antibacterial]. Journal of Plant Researches (Iranian Journal of Biology). 2015; 28(1): 34-41. [Article in Persian]

18. Akbarian J, Khomeiri M, Sadeghi Mahoonak A, Mahmoodi E. [Antimicrobial effect of extracts Phoenix Dactylifera against pathogenic bacteria and spoilage molds]. Electronic Journal of Food Processing and Preservation. 2013; 5(1): 1-12. [Article in Persian]

19. Ahmady-Asbchin S, Nasrolahi Omran A, Jafari N, Mostafapour MJ, Kia M. [Antibacterial effects of Lavandula Stoechas Essential oil, on gram positive and negative bacteria in vitro]. Med Lab J. 2012; 6(2); 35-41. [Article in Persian]

20. Habibipour R, Moradi Haghgou L. [Study on hydro-alcoholic extract effect of pomegranate peel on pseudomonas aeruginosa biofilm formation]. Avicenna J Clin Med. 2015; 22(3): 195-202. [Article in Persian]

21. Freitas E, Aires A, Rosa EA, Saavedra MJ. Antibacterial activity and synergistic effect between watercress extracts, 2-phenylethyl isothiocyanate and antibiotics against 11 isolates of Escherichia coli from clinical and animal source. Lett Appl Microbiol. 2013; 57(4): 266-273.

22. Abdul DA, Majeed S.N, Ameen B.H. Antioxidant activity, total phenolic content and antimicrobial activity of two medicinal plants from Sulaimani City, Iraqi Kurdistan Region. Advances in Life Science and Technology. 2014; 18: 65-71.

www.SID.ir

Archive of SID

Original Paper

Effect of methanolic extract of *Nasturtium officinale* on growth and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*

Aryan Omidi (M.Sc), Asghar Sharifi (Ph.D)*[2]

[1]**M.Sc in Microbiology, Young Researchers and Elite Club, Yasooj Branch, Islamic Azad University, Yasooj, Iran.**
[2]**Associate Professor, Cellular and Molecular Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran.**

Downloaded from goums.ac.ir at 11:04 +0430 on Sunday July 8th 2018

Abstract

Background and Objective: Biofilms caused by pathogenic microorganisms that plays an important role against human health. Due to their resistance to detergents and antimicrobial agent, treatment response of affected patients with these bacteria is difficult. This study was done to evaluate the effect of methanol extract of *Nasturtium officinale* plant on growth and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*.

Methods: In this descriptive - laboratory study, the extraction was done by Maceration in 80% methanol and by rotary evaporator. The minimum inhibitory concentration (MIC) of *Nasturtium officinale* extracts were determined by broth microdilution method. Biofilm formation was investigated using the microtiter plate and stained with crystal violet.

Results: The minimum inhibitory concentration of *Nasturtium officinale* against *Pseudomonas aeruginosa* was 0.625 mg/ml and the Minimum bactericidal concentration of this extract was 1.25 mg/ml. PAO1 strain and 5 clinical strains were able to biofilm formation. Inhibition of biofilm formation by extract of *Nasturtium officinale* plant was dependent to concentration. The highest percentage of inhibition of biofilm formation was in the concentration of 7.5 mg/ml and the lowest percentage of inhibition of biofilm formation was in the concentration of 0.11 mg/ml. The mean of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm inhibition by *Nasturtium officinale* extracts was 72.69±22.27 %. In the concentrations of 7.5, 0.93, 0.46, 0.23 and 0.11 mg/ml, there was a significant difference between clinical strains and PAO1 strain ($P<0.05$).

Conclusion: Methanolic extracts of *Nasturtium officinale* plant has anti-bacterial and anti-biofilm effect against *Pseudomonas aeruginosa*.

Keywords: *Nasturtium officinale*, *Pseudomonas aeruginosa*, Biofilm, MIC

*** Corresponding Author: Sharifi A (Ph.D), E-mail: asgharsharifi@yahoo.com**

Received 9 May 2017 **Revised** 5 Jul 2017 **Accepted** 22 Aug 2017

Aryan Omidi (https://orcid.org/0000-0002-6824-3776), Asghar Sharifi (https://orcid.org/0000-0001-7856-0313)

Cite this article as: Omidi A, Sharifi A. [Effect of methanolic extract of *Nasturtium officinale* on growth and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*]. J Gorgan Univ Med Sci. 2018 Summer; 20(2): 102-108. [Article in Persian]

www.SID.ir