**مقاله پژوهشی**

# بررسی خاصیّت ضدّمیکروبی عصاره های اتانولی گیاهان آویشن، مورد و سیر بر روی تشکیل بیوفیلم استافیلوکوکوس آرئوس

***زهرا سپهری[1]، علی اکبر نصیری[2]، مهران حصارکی[3] ، فرشته جوادیان*[4]، زهره کیانی[5] زیبا فولادوند[6]***

[1] استادیار ،پزشک ،گروه داخلی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زابل، ایران

[2] استادیار، پزشک ، گروه بیهوشی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زابل، ایران

[3] استادیار،پزشک ، گروه اطفال و نوزادان، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زابل، ایران

[4] کارشناس ارشد تکوین ، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی ، دانشگاه علوم پزشکی زابل،ایران

[5] دانش آموخته پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، ایران

[6] کارشناس ارشد بیوتکنولوژی، مرکز تحقیقات و فناوری( بیوسنتر)، دانشگاه ملی زابل، ایران

**نشانی نویسنده مسئول:** کارشناس ارشد تکوین ، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی ، دانشگاه علوم پزشکی زابل،ایران ، فرشته جوادیان
E-mail: fereshteh.javadian@yahoo.com

**وصول:۹۳/۳/۲۸، اصلاح:۹۳/۴/۲۹، پذیرش:۹۳/۵/۵**

## چکیده

**زمینه و هدف:** جمعیّت های متشکّل از یک گونه یا گونه های متنوّع باکتری به صورت چسبیده به یکدیگر و یا به سطوح زنده و غیر زنده در زمینه ای از پلی ساکاریدهای خارج سلولی بیوفیلم نامیده می شود. توسعه بیوفیلم یک فرآیند پیچیده است که نیازمند رفتارهای جمعی باکتری می باشد و در مقایسه با زندگی منفرد فوایسد زیادی را برای باکتری در بر دارد. بیوفیلم پراکنش باکتری و بیماری زایی باکتری را افزایش می دهد. از آن‌جایی که این باکتری ها نسبت به آنتی بیوتیک های مختلف مقاوم می باشد؛ امروزه از عصاره های گیاهی برای از بین بردن آنها استفاده می کنند. هدف این تحقیق بررسی اثر ضدّ میکروبی عصاره های چند نمونه گیاهی بر روی میزان تشکیل بیوفیلم استافیلوکوکوس آرئوس مقاوم به آنتی بیوتیک است.

**مواد و روش ها:** ۱۷ سویه استافیلوکوکوس اورئوس از حلق و بینی افراد بیمارستانی و غیر بیمارستانی جدا شده است و بررسی اثر عصاره های گیاهی بر روی تشکیل بیوفیلم استافیلوکوکوس اورئوس با استفاده از میکروپلیت های ۹۶ خانه تعیین شده است.

**یافته ها:** اثر ضدّ باکتریایی عصاره گیاه هان سیر، آویشن و مورد در غلظت های مختلف نشان داد که علی رغم مقاومت نسبی اکثر سویه ها در غلظت های مورد استفاده، بیشترین حساسیّت در غلظت های ۱.۲۵، ۲.۵ و ۵ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره ها می باشد و غلظت ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر از همه عصاره ها به عنوان(حداقل غلظت کشندگی) MBC در نظر گرفته شده است. در غلظت های MIC هر عصاره گیاه تشکیل بیوفیلم به طور کامل متوقّف شده و در زمان ۲۴ ساعت تنها رشد باکتری مشاهده شده و هیچ‌گونه بیوفیلمی در معرض هیچ‌کدام از عصاره ها دیده نشد؛ در صورتی که در کنترل بدون عصاره از زمان ۲۴ ساعت تشکیل بیوفیلم شروع شده و در ٦ ساعت بیشترین تشکیل بیوفیلم امّا، در ۲۴ ساعت میزان بیوفیلم کم‌تر شده است.

**نتیجه گیری:** نتایج نشان داد که عصاره های گیاهی کاهش دهنده تشکیل بیوفیلم استافیلوکوکوس اورئوس می باشند؛ این امر نقش مهمی در کاهش بیماری دارد.

**واژه های کلیدی:** *عصاره گیاهی، بیوفیلم، استافیلوکوکوس اورئوس، مقاومت آنتی بیوتیکی.*

## مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس یک باکتری گـرم مثبـت است که در پوست رشـد و نمـو مـی کنـد و در قسـمت ابتدایی بیمی ۲۵ تا ۳۰ درصد افراد بدون نشانه های بالینی مشخص وجود دارد و به عنوان مهمترین مخازن گسـترش آلودگی شناخته می شوند. استافیلوکوکوس اورئوس یکی از باکتری های بیماری زایی است کـه تولیـد کاتـالاز مـی کند. این باکتری نقـش مهمـی در بـروز مسـمومیّت هـای غـذایی، عفونـت‌هـای چرکـی، سیسـتمیک و بیمارسـتانی دارد(۱). استافیلوکوکوس اورئوس دومـین عامـل بیمـاری زایی در عفونـت هـای بیمارسـتانی مـی باشـند. مقاومـت استافیلوکوکوس اورئوس به پنی سیلین از سال ۱۹۵۰ آغاز شده و با ظهور آنتی بیوتیک‌های جدیدتر مـوارد مقاومـت به این داروهـا نیـز افـزایش یافـت(۲،۳) و از سـال ۱۹۹۸ اسـتافیلوکوکوس اورئـوس مقـاوم بـه متـی سـیلین و بـه صورت نسبی به ونکومایسین گزارش گردیده اسـت. ایـن باکتری ها برای ایجاد بیماری فاکتورهای مختلفی از جمله بیوفیلم تولید می کند که جمعیّـت هـایی متشـکّل از یـک گونه یا گونه های متنوّع باکتری بـه صـورت چسـبیده بـه یکـدیگر و یـا بـه سـطوح زنـده و غیـر زنـده از پلـی ساکاریدهای خارج سلولی بیوفیلم نامیده می شود. تشکیل بیوفیلم شامل مراحل زیر مـی باشـد: ۱- اتّصـال برگشـت پذیر سـلول‌هـای پلانگتونیـک بـه سـطوح ۲- اتّصـالات برگشت ناپذیر سلول‌ها و تشـکیل میکروکلنـی ۳- تولیـد موادّ پلیمری خارج سـلولی ٤- بلـوغ نهـایی بیـوفیلم(٤). بیوفیلم ها مـی تواننـد بـرروی سـطوح مختلفـی تشـکیل شوند(۵). این باکتری ها برای ایجـاد بیمـاری فاکتورهـای مختلفی از جمله بیوفیلم تولید می کنـد(٦). بیـوفیلم یـک جامعه سـاختاری و بیـانگر اجتمـاعی از میکرواورگانیسـم است که توسّط محصولات پلی مری لعابی کـه خودشـان تولید کرده اند در فضای موجود ما بین آنها قرار می گیـرد و به یک سطح متّصل می شود(۷) . تشکیل بیـوفیلم یـک فرآینـد فعّـال اسـت و شـامل اتّصـال اوّلیّـه ، تشـکیل میکروکلنی ، تولید مادّه پلـی مریـک خـارج سـلولی ، بـه دنبال آن رشد و بلوغ و در نهایـت کنـده شـدن و رهـایی سلول از بیـوفیلم مـی باشـد(۷) .گسـترش بیـوفیلم علّـت اصلی عفونت های بیمارستانی می باشد؛ چرا کـه بـاکتری که به سطح متّصل شده و به وسیله پلی ساکارید خـارجی در برابر انواع مختلف آنتی بیوتیـک هـا و دیگـر اسـترس های محیطی محافظت می شود و بیوفیلم پراکنش بـاکتری و بیماری زایی باکتری را افزایش می دهد . بیـان فنوتیـپ مثبت بیوفیلم وابسـته بـه حضـور گلـوکز ، کلریـد سـدیم (NaCl) و دیگر شرایط محیطی می باشد(٦). چـون ایـن باکتری ها نسبت به آنتی بیوتیک های مختلف مقـاوم مـی باشند به تازگی با توجّه به اثرات جانبی آنتی بیوتیک های مصرفی و مقاومتی که پاتوژن هایی نظیر اسـتافیلوکوکوس اورئوس در برابر آن هـا کسـب نمـوده انـد، بـه عملکـرد ضدّمیکروبی عصـاره هـا و ترکیبـات طبیعـی گونـه هـای مختلف گیاهی توجّه زیادی شـده اسـت . هـدف از ایـن تحقیق در ابتدا بررسی اثر ضدّ میکروبی عصـاره گیاهـان ، آویشن، مورد و سیر علیـه جدایـه هـای اسـتافیلوکوکوس آرئوس مقاوم به آنتی بیوتیک استفاده شده است.

## مواد و روش ها

### تهیه عصاره

گونه مورد استفاده در این تحقیق از استان سیستان و بلوچستان و کرمان جمع آوری شد و مـورد تأییـد گیـاه شناس دانشگاه قرار گرفت. گیاه خـرد شـد. جهـت تهیّـه عصاره ٤۰ گرم پودر خشک گیاه در داخل ارلن هـای نـیم لیتری حاوی ۲۰۰ میلی لیتـر اتـانول ۹٦٪ قـرار داده شـد. جداسازی حلّال از عصاره با دستگاه روتـاری و بـا کمـک پمپ خلا (تقطیر در خلا ) انجام گرفت . عصاره حاصـل وزن و در حلّال DMSO حل شد. عصاره تا زمان استفاده در آزمایش های ضدّ میکروبی در دمـای ٤ درجـه سـانتی گراد در یخچال نگهداری شد (۸).

### سویه ها باکتری

سویه های مختلف استافیلوکوکوس اورئوس مورد استفاده در این تحقیق از نمونه های بیماران شهرستان زابل جداسازی و بر روی محیط های کشت اختصاصی ماتیتول سالت آگار و بلاد آگار کشت داده شدند. سویه های خالص به دست آمده بر روی محیط کشت مصنوعی با استفاده از تست رنگ آمیزی گرم، کاتالاز، مانیتول سالت آگار در حدّ جنس شناسایی و در نهایت با انجام تست کوآگولاز به روش لوله ای و لامی و بررسی تشکیل آگلوتیناسیون، گونه استافیلوکوکوس اورئوس تعیین هویّت شدند.

**فعّالیّت آنتی بیوتیکی**

۱۷ سویه خالص ازگونه استافیلوکوکوس اورئوس با روش کربی- بائر تعیین آنتی بیوگرام شده و حساسیّت آنها نسبت به آنتی بیوتیک ها مورد ارزیابی قرار گرفت . آنتی بیوتیک های مورد استفاده در این بررسی شامل تری متوپریمSXT ,(1.25+23.15 µg)، آمپی سیلین (25 µg) AM، سفتازیدیم GAZ ,(30 µg) ، تتراسیکلین ,(30 µg) TE، اریترومایسینE ,(15 µg) ،پنی سیلینP,(10 µg) ، سفتریاکسون CRO ,(30 µg)، آمیکاسینAN,(10 µg) (ساخت شرکت پادتن طب ) بودند. پس از ۲٤ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی گراد قطر هاله های باز دارنده اندازه گیری شد و حساسیّت و مقاومت سویه ها تعیین و نتایج آن با جدول استاندارد NCCLS مقایسه شد.

تعیین حدّاقل غلظت مهار کنندگی (MIC)

حساسیّت جدایه های باکتری دارای مقاومت چند گانه نسبت به عصاره گیاهی مختلف با استفاده از روش رقت سازی در چاهک بررسی شد. به هفت چاهک از پلیت های میکروتیتر میزان ۱۰۰ میکرولیتر از محیط مایع مغذّی مولر هینتون براث (MHB) اضافه شد. به چاهک اوّل ۱۰۰ میلی لیتر از محلول رقیق شده عصاره اضافه شده و پس از مخلوط کردن ۱۰۰ میکرولیتر از چاهک اوّل برداشته به چاهک دوم اضافه گردید و بدین ترتیب تا آخرین چاهک این کار انجام داده شد. از چاهک آخر ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت خارج گردید. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی حاوی $10^7$ واحد در میلی لیتر معادل ۰/۵ مک فارلند به همه چاهک ها اضافه شد و در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدّت ۲٤ ساعت قرار گرفت. اوّلین چاهکی که از رشد باکتری پس از قرار دادن در انکوباتور جلوگیری کرده است به عنوان (MIC) در نظر گرفته می شود(۱).

**روش میکروتیتر پلیت برای تعیین کمیّت تشکیل بیوفیلم توسط باکتری‌ها**

مراحل انجام آزمایش

برای سنجش قدرت تشکیل بیوفیلم توسّط باکتری‌های جدا شده، یک کشت ۱۸ تا ۲٤ ساعته از هر ایزوله در تریپتیکاز سوی براث در دمای ۳۰°C تهیه شد. سپس یک میلی‌لیتر از این محیط کشت به ۱۰ میلی‌لیتر از محیط TSB استریل اضافه شد و کدورت آن از طریق قرائت جذب نوری سوسپانسیون بین ۰/۰۸ تا ۰/۱ در طول موج ٦۲۵ nm تنظیم گردید. این عمل با دستگاه اسپکتروفتومتر انجام شد. کدورت این سوسپانسیون معادل استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند می‌باشد و حاوی بیش از $10^8$ باکتری در هر میلی‌لیتر است. سپس از این سوسپانسیون، ۲۵۰ میکرولیتر به هر چاهک در میکروپلیت انتقال داده شد. هر هشت چاهک در میکروپلیت با یک سوسپانسیون باکتریایی مشخص پر شدند که در این صورت در هر چاهک نزدیک به ۲۵×۱۰٦ cfu/well باکتری موجود می‌باشد. چاهک‌های شاهد فقط حاوی محیط استریل می‌باشند. جنس میکروپلیت‌های ۹٦ چاهکی، پلی‌استیرن می‌باشد و ظرفیّت هر چاهک ۳۰۰ میکرولیتر است و ۵۰ میکرولیتر از عصاره گیاه با غلظت ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر نیز استفاده شده است. سپس سطح پلیت‌ها پوشیده شد و انکوباسیون به مدّت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷°C صورت گرفت. بعد از گذشت ۲٤ ساعت، محلول موادّ غذایی و سوسپانسیون میکروبی از چاهک‌ها خارج شد و هر چاهک سه مرتبه توسّط ۳۰۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژی

استریل شسته شد. همچنین پلیت‌ها به منظور حذف سلول‌های پلانکتونیک یا غیر متّصل در حین شستن به شدّت تکان داده می‌شوند. سپس باکتری‌های متّصل به دیواره و کف چاهک، با ۲۵۰ میکرولیتر اتانل ۹۶٪ تثبیت شدند. بعد از ۱۵ دقیقه، محتویات چاهک‌ها تخلیّه شد . پلیت‌ها برای خشک شدن در محلّی در آزمایشگاه قرار گرفتند. بعد از خشک شدن، پلیت‌ها به مدّت ۵ دقیقه با ۲۰۰ میکرولیتر رنگ کریستال ویوله ۲٪ که برای رنگ‌آمیزی گِرم مورد استفاده قرار می‌گیرد، رنگ‌آمیزی شدند. بعد از گذشت این مدّت زمان، رنگ‌های اضافی از طریق قرار دادن پلیت‌ها در مسیر جریان آب لوله شهری شسته شدند. این رنگ برای سنجش میزان بیوفیلم بسیار مناسب است. همچنین می‌تواند برای سنجش اثرات بیوسایدها بر روی بیوفیلم مورد استفاده قرار گیرد. بعد از شستن رنگ‌های اضافی، پلیت‌ها در دمای آزمایشگاه قرار گرفت تا خشک شوند. بعد از خشک شدن پلیت‌ها، بیوفیلم‌ها به صورت حلقه‌های ارغوانی رنگی بر روی چاهک‌ها قابل مشاهده بودند. سپس سنجش کمّی تولید بیوفیلم به وسیله اضافه کردن ۲۰۰ میکرولیتر اسید استیک ۳۳٪ به هر چاهک صورت گرفت. سپس جذب نوری(OD) رنگ کریستال ویوله موجود در حلّال رنگ‌بر در طول موج ٤٩٢ nm به وسیله دستگاه ELISA reader خوانده شد.

## یافته ها

### واکنش باکتری به آنتی بیوتیک

فعّالیّت ضدّ باکتریایی چند آنتی بیوتیک علیه سویه های به‌دست آمده در شرایط آزمایشگاهی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج این آزمون نشان داد که سویه های استافیلوکوکوس اورئوس رفتار تقریباً مشابهی در شرایط

**جدول ۱: الگوی حساسیّت سویه های باکتری استافیلوکوکوس اورئوس مورد بررسی نسبت به آنتی بیوتیک ها**

| آنتی بیوتیک | | | | | | | | *سویه باکتری |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| AN | CRO | P | E | TE | GAZ | AM | SXT | S. aureus |
| S | I | R | I | S | I | S | R | Sa1 |
| S | I | R | R | R | R | R | R | Sa2 |
| S | I | R | I | S | S | S | R | Sa3 |
| S | I | R | R | I | S | R | R | Sa4 |
| S | S | R | R | S | S | R | R | Sa5 |
| S | I | R | R | I | S | R | R | Sa6 |
| S | I | S | R | R | R | R | R | Sa7 |
| S | I | R | R | R | S | R | R | Sa8 |
| S | I | R | R | I | S | S | S | Sa9 |
| R | R | R | R | I | S | R | R | Sa10 |
| S | I | R | R | I | S | R | R | Sa11 |
| S | I | R | R | S | R | R | S | Sa12 |
| S | I | R | R | R | I | R | R | Sa13 |
| S | R | R | R | I | R | I | R | Sa14 |
| S | R | R | R | I | I | R | I | Sa15 |
| R | R | R | R | I | S | R | S | Sa16 |
| S | S | I | S | S | R | I | S | Sa17 |

Sa: Staphyloccocus aureus* R: Resistant S: Sensitive I: Intermediate
CF=cefexime, CAZ=ceftazidime, CRO=ceftriaxone, AN=amikacin, P=penicillin, E=erithromycin, TE=tetracycline, AM= ampicillin, SXT=trimethoprime.

**جدول ۲: اثر غلظت‌های مختلف عصاره گیاه در تشکیل بیوفیلم استافیلوکوکوس اورئوس حسّاس به متی سیلین و نمونه کنترل در زمان ۲ ساعت**

| عصاره ها | 0.62mg/ml concentration | 1.25mg/ml concentration | 2.5mg/ml concentration | 5mg/ml concentration | 10mg/ml concentration | 0 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ۱- آویش | 0.005 | 0.002 | 0.001 | 0 | 0 | 0.007 |
| ۲- سیر | 0.005 | 0.004 | 0.003 | 0.001 | 0 | 0.008 |
| ۳- مورد | 0.009 | 0.007 | 0.005 | 0.004 | 0.002 | 0.010 |

**جدول ۳: اثر غلظت‌های مختلف عصاره گیاه در تشکیل بیوفیلم استافیلوکوکوس اورئوس حسّاس به متی سیلین و نمونه کنترل در زمان ٤ ساعت**

| عصاره ها | 0.62mg/ml concentration | 1.25mg/ml concentration | 2.5mg/ml concentration | 5mg/ml concentration | 10mg/ml concentration | 0 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ۱- آویشن | 0.012 | 0.011 | 0.010 | 0.010 | 0.009 | 0.013 |
| ۲- سیر | 0.008 | 0.008 | 0.007 | 0.005 | 0.004 | 0.010 |
| ۳- مورد | 0.010 | 0.008 | 0.005 | 0.003 | 0.001 | 0.016 |

**جدول ٤: اثر غلظت‌های مختلف عصاره گیاه در تشکیل بیوفیلم استافیلوکوکوس اورئوس حسّاس به متی سیلین و نمونه کنترل در زمان ٢٤ ساعت**

| عصاره ها | 0.62mg/ml concentration | 1.25mg/ml concentration | 2.5mg/ml concentration | 5mg/ml concentration | 10mg/ml concentration | 0 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ۱آویشن | 0.013 | 0.010 | 0.010 | 0.009 | 0.006 | 0.014 |
| ۲ سیر | 0.011 | 0.009 | 0.005 | 0.003 | 0.002 | 0.011 |
| ۳ مورد | 0.015 | 0.014 | 0.012 | 0.009 | 0.005 | 0.017 |

**جدول۵: اثر غلظتهای مختلف عصاره گیاه در تشکیل بیوفیلم استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین و نمونه کنترل در زمان ۲ ساعت**

| عصاره ها | 0.62mg/ml concentration | 1.25mg/ml concentration | 2.5mg/ml concentration | 5mg/ml concentration | 10mg/ml concentration | 0 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ۱- آویشن | 0.003 | 0.003 | 0.003 | 0.002 | 0.001 | 0.011 |
| ۲- سیر | 0.009 | 0.007 | 0.004 | 0.003 | 0.003 | 0.010 |
| ۳- مورد | 0.012 | 0.007 | 0.007 | 0.006 | 0.005 | 0.016 |

**جدول ٦: اثر غلظت‌های مختلف عصاره گیاه در تشکیل بیوفیلم استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین و نمونه کنترل در زمان ٤ ساعت**

| عصاره ها | 0.62 mg/ml concentration | 1.25 mg/ml concentration | 2.5 mg/ml concentration | 5 mg/ml concentration | 10 mg/ml concentration | 0 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ۱- آویشن | 0.011 | 0.011 | 0.010 | 0.009 | 0.008 | 0.012 |
| ۲- سیر | 0.012 | 0.011 | 0.011 | 0.010 | 0.008 | 0.012 |
| ۳- مورد | 0.015 | 0.014 | 0.011 | 0.010 | 0.006 | 0.022 |

**جدول ٦: اثر غلظت‌های مختلف عصاره گیاه در تشکیل بیوفیلم استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین و نمونه کنترل در زمان ٢٤ ساعت**

| عصاره ها | 0.62 mg/ml concentration | 1.25 mg/ml concentration | 2.5 mg/ml concentration | 5 mg/ml concentration | 10 mg/ml concentration | 0 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ۱- آویشن | 0.014 | 0.011 | 0.010 | 0.009 | 0.008 | 0.016 |
| ۲ - سیر | 0.014 | 0.012 | 0.010 | 0.008 | 0.005 | 0.015 |
| ۳- مورد | 0.017 | 0.015 | 0.010 | 0.007 | 0.005 | 0.023 |

حضور آنتی بیوتیک ها از خود نشان می دهند؛ امّا، با این وجود تفاوت هایی در بین جدایه ها در بروز عملکرد مقاومت یا حساسیّت به آنتی بیوتیک دیده شد به طوری که ٦ سویه (سویه های شماره ۲، ۸، ۱۰، ۱۳، ١٤) نسبت به اغلب آنتی بیوتیک ها مقاوم بودند (جدول ۱).

بیشترین و کم‌ترین غلظت عصاره

اثر ضدّ باکتریایی عصاره گیاه هان سیر، آویشن و مورد در غلظت های مختلف نشان داد که علی رغم مقاومت نسبی اکثر سویه ها در غلظت های مورد استفاده، بیشترین حساسیّت در غلظت های ۱.۲۵، ۲.۵ و ۵ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره ها می باشد و غلظت ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر از همه عصاره ها به عنوان MBC در نظر گرفته شده است . کنترل منفی در این مطالعه محیط کشت بدون باکتری و عصاره گیاه بوده است.

نتایج گذاشتن غلظت هـای مختلـف عصـاره بـر تشـکیل بیوفیلم

در غلظت های MIC هر عصاره گیاه تشکیل بیوفیلم به طور کامل متوقّف شده و در زمان ٢٤ ساعت تنها رشد باکتری مشاهده شد و هیچ‌گونه بیوفیلمی در معرض هیچ‌کدام از عصاره ها دیده نشد. در صورتی که در کنترل بدون عصاره از زمان ٢٤ ساعت تشکیل بیوفیلم شروع شد و در ٦ ساعت بیشترین تشکیل بیوفیلم امّا، در ٢٤ ساعت میزان بیوفیلم کم‌تر شده است.

## بحث

تشکیل بیوفیلم سبب می شود که باکتری ها به عوامل ضدّ میکروبی مقاوم شوند(٩،١٠). با توجّه به افزایش مقاومت باکتری‌ها به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها تلاش برای دستیابی به آگاهی‌های بیشتر از موارد استفاده مؤثّر ترکیبات موجود در گیاهان و کاربرد شان در درمان بیماری‌های مختلف صورت گرفته است. در این بررسی اثر عصاره اتانولی سیر، مورد و آویشن بر روی تشکیل بیوفیلم سویه‌های مقاوم به متی سیلین و حساس به متی سیلین استافیلوکوکوس اورئوس که جزء بیمارگرهای عمده بیمارستانی بوده و سیر مقاومت آن به انواعی از آنتی‌بیوتیک‌ها رو به افزایش است، مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که اثر ضد باکتریایی عصاره گیاه هان سیر، آویشن و مورد در غلظت های مختلف نشان داد که علی رغم مقاومت نسبی اکثر سویه ها در غلظت های مورد استفاده، بیشترین حساسیّت در غلظت های ١.٢٥، ٢.٥ و ٥ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره ها می باشد و غلظت ١٠ میلی گرم بر میلی لیتر از همه عصاره ها به عنوان MBC در نظر گرفته شده است. Al-saimary نشان داد که عصاره برگ مورد مهار کننده قوی پسودوموناس آئروژینوزا می باشد (١١).

Yadegarinia فعالیت ضدّمیکروبی اسانس مورد در برابر اشرشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس و کاندیدیا آلبیکنس نشان داد (١٢). در مطالعه Moussa و همکاران نتایج نشان داد که عصاره متانولی مورد قطر هاله های مهاری ٢٥ و ٢٦ میلی متر به ترتیب در برابر Erwinia carotovora و Ralstonia solanacearum ایجاد کرده است(١٣). در مطالعات تیموری نتایج نشان داد که اسانس آویشن دارای ٣٠ ترکیب میباشد که ترکیبات اصلی آن شامل تیمول(٢٩/٨٪) و کاراکرول(١٣/٦٪) است بررسی فعالیت ضدّمیکروبی اسانس آویشن نشان می دهد که Staphylococcus aureus به آن حساس هستند در حالی که باکتری های گرم منفی ( Ecoli,Klebsial. pneumoniae) نسبت به اسانس هیچ حساسیّتی از خود نشان ندادند(١٤).در مطالعات آخوندزاده و همکاران اسانس آویشن با غلظت ٠/٠٠٥، ٠/٠١٥ و ٠/٠٣بر روی استافیلوکوکوس اورئوس مؤثّر بوده و با افزایش غلظت اسانس رشد باکتری هم کاهش یافته است (١٥). در مطالعه okoye و همکاران نتایج نشان داد عصاره گیاهی سیر دارای اثر ضدّمیکروبی بالایی علیه Ecoli با قطر هاله مهاری(١٧-٣٥mm) و Staphylococcus aureus با قطر هاله مهاری (١٦-٣٠mm) است. همچنین حدّاقل غلظت مهار کننده(MIC) برای باکتری E.coli (٣٠mg/ml) و برای S.aureus(٥٠mg/ml) است(١٦). در مطالعه مجنونی و همکاران نتایج نشان داد که حدّاقل غلظت مهار کننده(MIC) عصاره گیاهی سیر برای استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به ونکومایسین ٢٥٦mg/mlاست(١٧).

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که حداقل غلظت مهار کنندگی عصاره هر گیاه باعث مهار تشکیل بیوفیلم باکتری ها شده است و هیچ‌گونه بیوفیلمی در معرض هیچ‌کدام از عصاره ها دیده نشد. در صورتی که در کنترل بدون عصاره(محیط کشت بدون عصاره) از زمان ٢٤ ساعت تشکیل بیوفیلم شروع شده و در ٦ ساعت بیشترین تشکیل بیوفیلم امّا، در ٢٤ ساعت میزان بیوفیلم کم‌تر شده است و حلّال نیز به عنوان کنترل در نظر گرفته شده است. در مطالعه Aishami نتایج نشان داد که عصاره چای ترش مهار کننده تشکیل بیوفیلم کاندیدا آلبیکنس می باشد(١٨). در مطالعه Namasivayam نتایج نشان داد که

عصاره های گیاهان سنجد، نوعی پنج انگشت(بنگلا) Tridax procumbens and Ocimum tenuiflorumi, مهار کننده تشکیل بیوفیلم اشرشیاکلی با غلظت‌های مختلف می باشند(۱۹). در مطالعه کیم و همکاران نتایج نشان داد که عصاره زردچوبه aCurcuma xanthoriz مهار کننده تشکیل بیوفیلم استرپتوکوکوس موتانس می باشد(۲۰). در مطالعه حسینی و همکاران نتایج نشان داد که عصاره بنه تشکیل بیوفیلم استرپتوکوکوس موتانس کاهش داده است(۲۱). بنابراین، در مجموع، اثرات عصاره های گیاهی برروی تشکیل بیوفیلم را می توان با اثرات این ذرّات بر رشد باکتری ها مرتبط دانست. جلوگیری از رشد باکتری ها موجب عدم تشکیل بیوفیلم می شود .

## تشکر و قدردانی

از دانشگاه علوم پزشکی زابل که حمایت مالی این پروژه را برعهده گرفتند،تشکر به عمل می آید.

## References


1. Kloos W.E. Staphylococcus. In: Topley & Wilson's Microbiology & Microbial infections.Collier L., Balows A., Sussman M. 9th. Arnold Co; USA. 1998;2: 577- 617.
2. Cunha BA, Methicillin resistant Staphylococcus aureus Clinical Manifestation and antimicrobial therapy. Clin Microbiol Infect. 2005; 11: 33-42.
3. CDC, Vancomycin-resistance Staphylococcus aureus-Pennsylvanian, 2002. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2002; 51(40): 902.
4. Bos R, Mei HC, Busscher HJ. Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions – its mechanisms and methods for study. FEMS Microbiology Reviews.1999; 23(2): 179-230.
5. Baty AM, Suci P A, Tyler B J, Geesey GG. Investigation of mussel adhesive protein adsorption on polystyrene and polyoctadecyl methacrylate using angle dependent XPS, ATR- TIR and AFM. Journal of Colloid and Interface Science. 1996; 177(2): 307–15.
6. Potter A, Ceotto H, Giambiagi-Demarval M, dos Santos KR, Nes IF, Bastos Mdo C. The gene bap, involved in biofilm production, is present in Staphylococcus spp. strains from nosocomial infections. J Microbiol. 2009; 47(3): 319-26.
7. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbiol Biofilm . Ann Rev Microbiol. 1995;49:711-45.
8. Hanafy MS, Hatem ME. Studies on the antimicrobial activity of Nigella sativa seed (black cumin). J Ethnopharmacol. 1991; 34(2-3): 275-8.
9. Austin JW, Bergeron G. Development of bacterial biofilms in dairy processing lines. J Dairy Res. 1990; 62(3): 509-19.
10. Danese PN, Pratt LA, Kolter R. Biofilm formation as a developmental process. Methods Enzymol.2001;336: 19–26.
11. Al-Saimary IE, Bakr SS, Jaffar T, Al-Saimary AE, Salim H, Al-Muosawi R, Effects of some plant extracts and antibiotics on Pseudomonas aeruginosa isolated from various burn cases. Saudi Med J. 2002; 23(7): 802-5.
12. Yadegarinia D, Gachkar L, Rezaei MB, Astanch SA, Rasooli I. Biochemical activities of Iranian Mentha piperita and Myrtus communis L. essential oils, Phytochemistry. 2006; 67(12): 1249-55.
13. Moussa AM, Emam AM, Mohamed MA, Diab YM. In vitro evaluation of some Egyptian plants against the rot bacteria and spider mite and isolation the active constituent(s) from Myrtus,communis leaves. International Food Research Journal. 2010; 17: 287-94. [Persian]
14. Teimouri M. Antimicrobial activity and essential oil composition of thymus daenensis celak from Iran. J Med Plant Res. 2012;6(4): 631-35.
15. Gandomi Nasrabadi H, Misaghi A, Akhund-Zadeh Basti A, Khosravi A, Bokaei S, Abbasifar A. Effect of thyme essential oil on Staphylococcus aureus growth in commercial soups. Quarterly herbs, 2008 ; 7(27): 45-51. [Persian]
16. Okoye LA. In Vitro Determination of Bactericidal Effects of Garlic (Allium sativum) on Staphylococcus aureus and Escherichi coli. Nigerian Journal of Scinece, Technology and Environmental Education (NIJOSTEE). 2010; 3(1): 152-6.
17. Majnooni M, Abiri R, Afnanzade N, Malek Khatabi P. Study of Antibacterial Effects of Hydro - alcoholic

Extract of 8 Medicinal Herbs Against Vancomycin Resistant Staphylococcus aureus. J Med Plants. 2012; 1 (41) :103-10. [Persian]
18. Alshami I, Alharbi AE. Hibiscus sabdariffa extract inhibits in vitro biofilm formation capacity of Candida albicans isolated from recurrent urinary tract infections. Asian Pac J Trop Biomed. 2014; 4(2): 104–8.
19. Namasivayam SK, Roy EA. Antibiofilm effect of medicinal plant extracts against clinical isolate of biofilm of Escherichia coli. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 2013; 5(2):486-9.
20. Kim JE, Kim HE, Hwang JK, Lee HJ, Kwon Hk, Kim BI. Antibacterial characteristics of curcuma xanthorrhiza extract on Streptococcus mutans biofilm. The Journal of Microbiology. 2008; 46(2): 228-32.
21. Hosseini F, Adlgostar A, Sharifnia F. Antibacterial Activity of Pistacia atlantica extracts on Streptococcus mutans biofilm . International Research Journal of Biological Sciences. 2013; 2(2): 1-7.

# Evaluation of the effect of antimicrobial activity of ethanol extract of Myrtus communis , Zataria multiflora Boiss and Allium sativum on biofilm formation by Staphylococcus aureus

***Zahra Sepehri.,***
Professor of Department of Internal Medicine, Dr, Faculty of Medicine, Zabol University of Medical Sciences, Iran

***Ali Akbar Nasiri.,***
Professor of Department of Anesthesiology, Dr, Faculty of Medicine, Zabol University of Medical Sciences, Iran

***Mehran Hesaraki.,***
Professor of Department of Pediatrics, Dr, Faculty of Medicine, Zabol University of Medical Sciences, Iran

***Fereshteh Javadian.,***
Master of Science in Development, Zabol Medicinal Plant Research Center, Zabol University of Medical Sciences, Iran

***Zohre Kiani.,***
Student of Medicine, Faculty of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Iran

***Ziba Fooladvand.,***
MSc in Biotechnology, Research and Technology Centre (Biocenter), National University of Zabol, Iran

**Received:**18/06/2014**, Revised:**20/07/2014**, Accepted:**27/07/2014

**Corresponding Author:**
Fereshteh Javadian,
Master of Science in Development,
Zabol Medicinal Plant Research Center, Zabol University of Medical Sciences, Iran
E-mail:
fereshteh.javadian@yahoo.com

## Abstract

**Background and Purpose:** Development of antibiotic resistance among pathogenic bacteria motivates attempts to search for newer antimicrobial agents. In this research study, antibacterial effect of plant extract of M. communis , z.multiflora and Allium sativum on biofilm formation by strains of Staphylococcus aureus resistant to the antibiotic were investigated.

**Methods and Materials:** 17 samples were separated from nose and throat of hospital and non-hospital personnels. The effect of extracts on biofilm formation by S.aureus and its resistant respect to the antibiotic were determined using a microplate 96 .

**Results:** Effect of antibacterial extracts used at different concentrations showed that, despite the relative resistance of most strains at concentrations used, the maximum sensitivity was at concentrations of 1.25, 2.5 and 5 mg/ml of extracts and concentration of 10 mg/ml of the extract was considered as MBC. Bacterial growth was observed only at 24 hours and no biofilm was observed at any of the extracts.

**Conclusion :** Results showed that plant extracts can reduce biofilm formation by Staphylococcus aureus and, therefore, they can play an important role in reducing disease.

**Keywords:** *Plant extract, Biofilm, S.aureus, Antibiotic resistance.*