فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال چهارم، شماره ۱۳، بهار ۱۳۹۴، صفحه ۴۳- ۵۶
تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۰/۲۳ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۲/۲۴

ارزیابی آثار مهاری عصاره‌های گیاه گز (*Tamarix hispida*) بر فرم منفرد و بیوفیلمی ۶ باکتری پاتوژن

زینب محسنی‌پور: کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، ایران، mohsenipourz20@gmail.com
مهدی حسن‌شاهیان*: استادیار میکروبیولوژی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، ایران، hasanshahi@gmail.com

چکیده

مقدمه: بیوفیلم‌های میکروبی از میکروارگانیسم‌های محصور در ماتریکسی از پلیمرهای خارج سلولی تشکیل شده‌اند. سازمان‌یابی سلول‌ها در ساختار یک بیوفیلم موجب کاهش اثربخشی ترکیبات ضدمیکروبی شده و مهار میکروارگانیسم‌ها را دشوارتر می‌کند. با توجه به مشکلات ناشی از تشکیل بیوفیلم‌ها در صنعت و پزشکی و همچنین گسترش مقاومت‌های دارویی، دستیابی به شیوه‌های نوین، به منظور مهار میکروارگانیسم‌های مقاوم به ویژه در شکل بیوفیلمی الزامی است. از این‌رو در این پژوهش، قابلیت مهاری عصاره‌های *Tamarix hispida* بر فرم منفرد و بیوفیلمی ۶ باکتری پاتوژن بررسی شد.

مواد و روش‌ها: اثربخشی عصاره‌ها بر فرم منفرد با آزمون انتشار دیسک تعیین و مقادیر MICو MBC به روش ماکروبراث دایلوشن به دست آمد. آثار ضد بیوفیلمی عصاره‌های *T. hispida* نیز با روش میکروتیتر پلیت بررسی شد.

نتایج: در این پژوهش، قابلیت عصاره‌های گیاه گز در مهار فرم منفرد و بیوفیلمی باکتری‌های پاتوژن تایید و مشخص شد که نوع اتانولی عصاره در مهار میکروارگانیسم‌ها کارآمدتر از نوع متانولی است. اثر مهاری عصاره‌ها بر ساختارهای بیوفیلمی هر باکتری به نوع حلال و غلظت عصاره وابسته بوده و بیش‌ترین اثر مهاری بر پدیده تشکیل بیوفیلم باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* (۸۷/۳۵ درصد) مشاهده شد. بیش‌ترین تخریب ساختارهای بیوفیلمی در تیمار با عصاره‌های *T. hispida* در باکتری *استرپتوکوکوس پنومونیه* (۶۲/۷۱ درصد) مشاهده شد. عصاره‌های یاد شده موجب کاهش درخور توجهی در فعالیت متابولیکی بیوفیلم‌ها نیز بودند که *باسیلوس سرئوس* بیش‌ترین کاهش (۸۸/۳۴ درصد) را در این سنجش نشان داد.

بحث و نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج این مطالعه قابلیت بالای عصاره‌های *T. hispida* در مقابله با باکتری‌های انتخابی تایید و این عصاره‌ها به عنوان گزینه مناسبی در مقابله با سویه‌های یاد شده پیشنهاد شدند.

واژه‌های کلیدی: بیوفیلم، *Tamarix hispida*، باکتری‌های پاتوژن، مقاومت دارویی، آثار ضدمیکروبی

* نویسنده مسؤول مکاتبات

مقدمه

بیوفیلم‌ها اجتماعات میکروبی سازمان‌یافته‌ای هستند که درون ماتریکسی از پلیمرهای آب‌دار خارج سلولی محصور شده و بر سطوح جان‌دار و یا بی‌جان تشکیل می‌شوند (۱). علاوه بر سطوح طبیعی، بر سطح تجهیزات صنعتی مانند سطوح درگیر در تهیه مواد غذایی، سیستم‌های توزیع و مخازن نگهداری آب، سیستم‌های تهویه هوا و مخازن نفتی نیز می‌توان ساختارهای بیوفیلمی را مشاهده کرد. تشکیل این ساختارها توسط ارگانیسم‌های پاتوژن بر سطوح تجهیزات پزشکی، ابزارهای کاشتنی و اعضای مصنوعی نیز مشکلات بالینی بسیاری را ایجاد کرده است (۲). افزون بر این، مقاومت یک میکروارگانیسم نسبت به عوامل ضدمیکروبی زمانی‌که این سلول در ساختاریک بیوفیلم وارد می‌شود، هزاران بار بیشتر از فرم منفرد خود شده و از این‌رو بیوفیلم‌ها یکی از علت‌های مهم بروز و گسترش مقاومت‌های دارویی محسوب می‌شوند (۳).

در دهه‌های اخیر گسترش مقاومت‌های دارویی درمیان میکروارگانیسم‌های پاتوژن از یک سو و آثار زیان‌بار ناشی از مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها از سوی دیگر، موجب شده تا پژوهش‌های بسیاری به منظور دستیابی به ترکیبات ضدمیکروبی جدید انجام شود (۴). در این راستا ترکیبات زیستی و به ویژه، گیاهان دارویی بسیار مورد توجه پژوهشگران بوده‌اند. سابقه طولانی کاربرد گیاهان دارویی در طب سنتی و شناسایی بسیاری از خواص درمانی‌شان طی سال‌های متمادی، همچنین مقبولیت عام، دسترسی آسان، هزینه پایین تولید و عدم بروز مشکلات زیست محیطی همه از مزایایی هستند که این گروه از مشتقات زیستی را به یکی از گزینه‌های مناسب برای مهار سویه‌های میکروبی مقاوم تبدیل کرده است (۵).

گیاه گز با نام علمی *Tamarix hispida* و به خانواده Tamaricaceae متعلق است. گز درختچه‌ای کوتاه با انشعابات زیاد و سخت بوده که گاه به علت جست‌های پاجوش به شکل درختچه در می‌آید. این گیاه بیشتر در اراضی شوره‌زار و مناطق خشک و نیمه خشک جهان و به ویژه ایران می‌روید. پوست درخت گز دارای مقادیری از تانن و اسید گالیک بوده و در برگ‌های آن اسکولین یافت می‌شود. پلی ساکارید گزنگبین نیز از این گیاه استخراج می‌شود. افزون بر برگ‌های گیاه یاد شده، صمغ گزانگبین نیز خواص درمانی دارد. از برگ‌های گز برای درمان اسهال، زخم‌های سوختگی، قطع خونریزی و التیام جوش‌های صورت استفاده می‌شود. گزانگبین نیز برای تسکین دل درد کودکان، رفع تنگی نفس و سر درد مفید است (۶ و ۷). در مطالعات بسیاری خواص ضدمیکروبی گونه‌های مختلف گیاه گز بررسی شده است. پژوهش‌های یاد شده بیشتر با تکیه بر فرم منفرد میکروارگانیسم‌ها انجام شده و به ساختارهای بیوفیلمی توجه کمتری شده است. برای مثال مشخص شده که عصاره‌ی گیاه *T. diocia* اثر مهاری مناسبی بر قارچ‌های *آسپرژیلوس فلاووس*، *کاندیدا آلبیکنس* و *کاندیدا گلبراتا* داشته (۸) و عصاره‌های گیاه *T. macrocapra* نیز باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سوبتیلیس* و *کاندیدا آلبیکنس* را به خوبی مهار می‌کند (۹). برای مثال قابلیت مهاری عصاره *T. diocia* بر قارچ‌های *آسپرژیلوس فلاووس*، *کاندیدا آلبیکنس* و *کاندیدا گلبراتا* تایید (۸) و همچنین، مشخص شده که گونه *T. macrocapra* قادر است باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سوبتیلیس* و *کاندیدا آلبیکنس* را به خوبی مهار کند (۹).

این پژوهش به منظور ارزیابی خواص ضد میکروبی عصاره‌های اتانولی و متانولی گونه جدیدی از گیاه گز (*T. hispida*) بر فرم منفرد و ساختارهای بیوفیلمی ۶ باکتری پاتوژن در آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه شهید باهنر کرمان انجام شد. میکروارگانیسم‌های یاد شده شامل ۳ باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس* و *استرپتوکوکوس پنومونیه* و ۳ باکتری گرم منفی *سودوموناس آئروژینوزا*، *اشرشیاکلی* و *کلبسیلا پنومونیه* بودند. باکتری‌های یاد شده همگی از پاتوژن‌های مهم انسانی محسوب می‌شوند که در دهه‌های اخیر با کسب مقاومت‌های دارویی مشکلات بسیاری را ایجاد کرده‌اند.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری، شناسایی و تهیه عصاره‌های گیاهی: گیاه گز از درختچه‌های حومه شهر رفسنجان جمع‌آوری و در هرباریوم دانشکده علوم دانشگاه شهید باهنر از نظر علمی شناسایی شد. ساقه‌های نازک و برگ‌های گیاه گز در سایه خشک و سپس، به کمک آسیاب برقی و الک تا حد ممکن پودر شد. ۵۰ گرم از پودر گیاه گز به ترتیب به ارلن‌های حاوی ۵۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد و ۵۰۰ میلی‌لیتر متانول ۹۶ درصد افزوده و درب ارلن‌ها با ورقه آلومینیومی، کامل بسته شد. به منظور استخراج ترکیبات موثر گیاه گز، ارلن‌ها به مدت ۲۴ ساعت به دستگاه شیکر با سرعت ۱۸۰ دور در دقیقه و دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد منتقل و سپس، برای حذف قطعات اضافی، محلول از کاغذ صافی عبور داده شد. محلول فیلتر شده برای تبخیر حلال اضافی در دستگاه روتاری وارد و سپس، در آون ۴۰ درجه سانتی‌گراد به پودر خشک عصاره تبدیل شد. مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم از پودر خشک هر عصاره در حجم مناسبی از دی متیل سولفوکساید حل و سپس، با عبور از فیلتر میلی‌پور استریل شد. پس از این محلول یاد شده با افزودن آب مقطر استریل به حجم یک میلی‌لیتر رسانده شده و این محلول به عنوان محلول ذخیره عصاره (۱۰۰ میلی‌گرم / میلی‌لیتر) تا زمان مصرف در ظروف شیشه‌ای استریل و تیره در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۱۰).

میکروارگانیسم‌های مورد بررسی: بررسی خواص ضدمیکروبی *T. hispida* بر باکتری‌های گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس* و *استرپتوکوکوس پنومونیه* و همچنین، باکتری‌های گرم منفی *سودوموناس آئروژینوزا*، *اشریشیا کلی* و *کلبسیلا پنومونیه* انجام شد. *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیا کلی* و *کلبسیلا پنومونیه* سویه‌های جداسازی شده از بیماران بوده و از آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی کرمان تهیه شدند. *باسیلوس سرئوس* سویه جداسازی شده از دام بوده و از دانشکده دامپزشکی دانشگاه باهنر تهیه شد. *سودوموناس آئروژینوزا* نیز سویه جداشده از خاک بوده و از دانشکده علوم دانشگاه باهنر تهیه شد. از هر میکروارگانیسم یک سویه انتخاب و کشت مرجع آن در یخچال نگهداری شده و هر ماه در نوترینت آگار تجدید کشت شد. در مورد *استرپتوکوک پنومونیه* از محیط بلاد آگار استفاده شد.

بررسی اثر ضدمیکروبی عصاره‌ها بر فرم منفرد به روش انتشار دیسک: تعیین قابلیت مهاری عصاره‌های الکلی *T. hispida* بر باکتری‌های انتخابی در ابتدا به کمک آزمون انتشار دیسک انجام شد. برای این منظور ۵ عدد دیسک بلانک استریل در شرایط آسپتیک به

محلول ذخیره عصاره (۱۰۰ میلی‌گرم / میلی‌لیتر) وارد و به مدت ۲ ساعت در آن باقی ماند. سپس، دیسک‌ها به یک پلیت استریل منتقل و حلال اضافه هر دیسک در آون ۴۰ درجه تبخیر شد (۱۱). در این بررسی دیسک آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل (۳۰ میکروگرم / دیسک) شاهد مثبت بود. برای اطمینان از عدم تأثیر هریک از حلال‌های به کاررفته در عصاره‌گیری و حل کردن مجدد عصاره‌ها، دیسک‌های آغشته به اتانول، متانول و دی متیل سولفوکساید به عنوان شاهد منفی آزمایش انتخاب شدند.

برای انجام آزمون انتشار دیسک، از محیط مرجع هر باکتری در محیط نوترینت براث[1] کشت ۲۴ ساعته تهیه و سپس، هر سوسپانسیون تا رسیدن به کدورتی معادل ۰/۵ مک فارلند[2] رقیق شد. از سوسپانسیون‌های یاد شده کمک سوآب استریل در محیط مولر هینتون آگار[3] کشت سفره‌ای انجام شد. پس از این دیسک‌های آغشته به عصاره، حلال و آنتی‌بیوتیک در شرایط آسپتیک و با فاصله‌های منظم بر سطح پلیت قرار گرفته و پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شدند. قطر هاله‌های مهاری هر دیسک پس از انکوباسیون با خط‌کش میلی‌متری اندازه‌گیری شد (۱۲).

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی عصاره‌های گیاهی: به منظور دستیابی به حداقل غلظت مهارکننده[4] عصاره‌های گیاه گزاز روش ماکروبراث دایلوشن و طبق پروتکل CLSI[5] استفاده شد (۱۰). بدین جهت ۱۰ غلظت ۵۰ تا ۰/۰۲ میلی‌گرم / میلی‌لیتر از محلول ذخیره عصاره و به شیوه رقیق سازی متوالی (۱۳) تهیه شد. ۱۰ لوله آزمایش استریل انتخاب و به هریک مقدار یک میلی‌لیتر محیط نوترینت براث استریل افزوده شد. سپس، به لوله اول یک میلی‌لیتر از محلول ذخیره عصاره وارد و به خوبی مخلوط شد تا غلظت نهایی عصاره در لوله اول ۵۰ میلی‌گرم / میلی‌لیتر به دست آید. یک میلی‌لیتر از این محلول در شرایط آسپتیک به لوله دوم منتقل و به خوبی مخلوط شد تا غلظت عصاره نصف لوله اول و ۲۵ میلی‌گرم / میلی‌لیتر شود. به همین ترتیب غلظت‌های سوم تا دهم عصاره در لوله‌های بعدی تهیه شد.

سپس، به هر غلظت مقدار یک میلی‌لیتر از کشت ۲۴ ساعته باکتری در محیط نوترینت براث که به کدورتی معادل ۰/۵ مک فارلند رسانده شده بود، افزوده شد. در این آزمون، لوله‌های کنترل مثبت حاوی سوسپانسیون میکروبی و آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین (۲ میلی‌گرم / میلی‌لیتر) (ثامن دارو، مشهد، ایران)، لوله‌های کنترل منفی حاوی سوسپانسیون میکروبی و آب مقطر استریل و در نهایت، لوله‌های شاهد عصاره حاوی غلظت مورد نظر از عصاره و محیط نوترینت براث بودند. تمامی مراحل یاد شده در شرایط آسپتیک انجام و لوله‌ها به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از انکوباسیون کدورت ایجاد شده در لوله‌های آزمون با کدورت کنترل منفی و شاهد عصاره مقایسه و کم‌ترین غلظتی که رشد باکتری در آن مهار شده بود به عنوان MIC انتخاب شد.

برای محاسبه حداقل غلظت کشندگی[6] عصاره‌های گیاه گز از لوله‌های مورد بررسی در آزمون MIC، در محیط مولر هینتون آگار فاقد عصاره گیاهی کشت انجام شده و کم‌ترین غلظتی که باکتری در آن رشد نکرد به عنوان MBC تعیین شد.

ارزیابی قابلیت مهاری عصاره‌های گیاهی بر پدیده تشکیل بیوفیلم: قدرت مهار پدیده تشکیل بیوفیلم در تیمار با عصاره‌های *T. hispida* به کمک روش

میکروتیتر پلیت بررسی شد. در ابتدا یک لوپ از کشت مرجع هر باکتری در محیط تریپتیکاز سوی براث[۷] منتقل و پس از ۱۸ ساعت انکوباسیون تا رسیدن به کدورتی معادل یک مک فارلند رقیق شد. غلظت‌هایی از عصاره که در این آزمون انتخاب شد شامل سه غلظت ۵۰ تا ۱۲/۵میلی‌گرم / میلی‌لیتر بود که به روش رقیق‌سازی متوالی و از محلول ذخیره عصاره با افزودن محیط تریپتیکاز سوی براث استریل تهیه شد. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از هر غلظت در شرایط آسپتیک به چاهک‌های آزمون میکروپلیت ۹۶ خانه استریل وارد و سپس، به هریک از این چاهک‌ها ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتریایی اضافه شد. در این آزمون چاهک کنترل مثبت، کنترل منفی و چاهک شاهد عصاره همانند آزمون تعیین MICدر نظر گرفته شدند. میکروپلیت به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، بدون حرکت انکوبه شد (۱۴).

به منظور بررسی اثر مهاری عصاره‌ها پس از انکوباسیون از روش رنگ‌آمیزی کریستال ویوله استفاده شد. در ابتدا محتویات چاهک‌های میکروپلیت به آرامی آسپیره و هر چاهک دو مرتبه با بافر سالین فسفات شسته شد. سپس، برای تثبیت ساختارهای بیوفیلمی ۱۵۰ میکرولیتر متانول به مدت ۱۵ دقیقه به چاهک‌ها افزوده شد. پس از آسپیره متانول، ۲۰۰ میکرولیتر کریستال ویوله (محلول یک درصد جرمی- حجمی در اتانول ۹۰ درصد) به چاهک‌ها وارد و میکروپلیت به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. رنگ اضافی هر چاهک با جریان آرام آب شیر شسته شده و پس از خشک شدن پلیت، جذب نوری هر چاهک با افزودن ۱۶۰ میکرولیتر اسید استیک گلاسیال ۳۳ درصد در طول موج ۶۳۰ نانومتر و با دستگاه الایزا ریدر معین شد (۱۵). درصد مهار تشکیل پدیده تشکیل بیوفیلم در تیمار با عصاره‌های *T. hispida* به کمک فرمول زیر محاسبه شد (۱۶):

$$\left[\frac{(C-B)-(T-E)}{(C-B)}\right] 100 \text{ *= percent Inhibition}$$

در این فرمول C میانگین جذب نوری چاهک‌های کنترل منفی، B میانگین جذب نوری چاهک‌های کنترل محیط، T میانگین جذب نوری چاهک‌های آزمون در غلظت مورد نظر و E میانگین جذب نوری چاهک‌های شاهد عصاره همان غلظت است.

بررسی قابلیت عصاره‌های گیاهی در تخریب ساختارهای بیوفیلمی: به منظور بررسی قابلیت عصاره‌های گیاه گز در تخریب ساختارهای بیوفیلمی باکتری‌های انتخابی، ابتدا بیوفیلم هر باکتری تشکیل و سپس، غلظت‌های مختلف عصاره (۵۰ تا ۱۲/۵ میلی‌گرم / میلی‌لیتر) بر این ساختارها اثر داده شد. در این آزمون نیزچاهک کنترل مثبت، کنترل منفی و چاهک شاهد عصاره همانند آزمون تعیین MIC در نظر گرفته شدند. این بررسی به روش سانداسی[۸] (۱۷) انجام و در آن برای تشکیل بیوفیلم، ۱۰۰ میکرولیتر از کشت ۲۴ ساعته باکتری‌ها در محیط تریپتیکاز سوی براثکه به کدورتی معادل یک مک فارلند رسانده شده بود به چاهک‌های آزمون و کنترل منفی میکروپلیت وارد و پلیت یاد شده به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه بدون حرکت انکوبه شد. شایان ذکر است که به چاهک‌های شاهد محیط کشت و شاهد عصاره این میکروپلیت نیز ۱۰۰ میکرولیتر محیط تریپتیکاز سوی براث استریل افزوده شده بود. پس از گذشت زمان

انکوباسیون، محتویات چاهک‌ها به آرامی و در شرایط آسپتیک آسپیره شد. به منظور حذف سلول‌های پلانکتونیک، چاهک‌ها دو مرتبه با بافر سالین فسفات شسته شدند و سپس، به چاهک‌های آزمون و شاهد عصاره مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از هر غلظت اضافه و پلیت یاد شده برای ۲۴ ساعت دیگر در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و بدون حرکت انکوبه شد. پس از این مدت میکروپلیت با روش رنگ‌آمیزی کریستال ویوله بررسی و درصد تخریب ساختارهای بیوفیلمی به کمک فرمولی که پیش‌تر اشاره شد محاسبه شد.

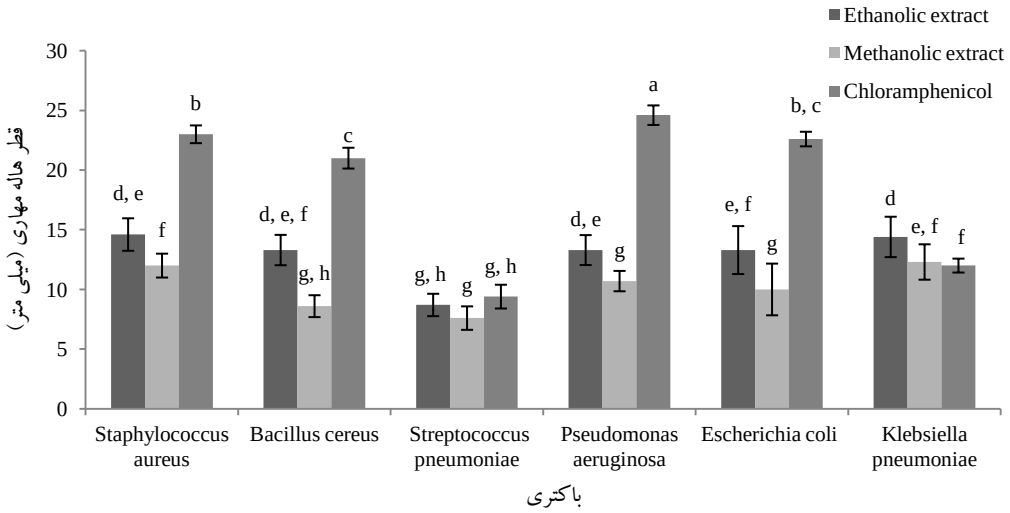
سنجش قابلیت عصاره‌های گیاهی در مهار فعالیت متابولیکی ساختارهای بیوفیلمی: در این بررسی نیز به همان طریق که در بخش قبل شرح داده شد، ابتدا ساختارهای بیوفیلمی تشکیل و سپس، غلظت‌های مورد نظر از عصاره (۵۰ تا ۱۲/۵ میلی‌گرم / میلی‌لیتر) بر این ساختارها اثر داده شد. پس از گذشت زمان انکوباسیون به چاهک‌های تیمار و شاهد مقدار ۵۰ میکرولیتر از رنگ TTC[۹] افزوده و میکروپلیت به مدت سه ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از این مدت جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ۴۹۰ نانومتر تعیین شد (۱۸).

تحلیل آماری یافته‌ها: همه آزمون‌ها در این بررسی با سه تکرار انجام شده، اختلاف بین داده‌ها با آزمون تحلیل واریانس (آنوا[۱۰]) و در نرم افزار اس. پی. اس. اس ۱۸[۱۱] مقایسه و اعداد دارای مقدار P[۱۲] کمتر از ۰/۰۵ معنادار فرض شدند. سپس، اختلافات حقیقی بین گروه‌ها در آزمون انتشار دیسک به کمک آزمون دانکن[۱۳] بررسی شد. در آزمون‌های انجام شده بر ساختارهای بیوفیلمی به علت فاکتورهای متعدد مؤثر در آزمایش و فزونی داده‌ها، از آوردن دسته‌بندی‌های آزمون یاد شده صرف نظر شده و آثار متقابل فاکتورهای مؤثر در هر آزمایش با آزمون ال. اس. دی[۱۴] بررسی شد.

نتایج

قابلیت عصاره‌های گیاهی در مهار فرم منفرد باکتری‌های مورد بررسی: قطر هاله‌های مهاری هریک از عصاره‌های اتانولی و متانولی *T. hispida* در شکل ۱ و مقادیر MIC و MBC عصاره‌های یاد شده در جدول ۱ آمده است. بر این اساس قدرت مهاری عصاره اتانولی بر فرم منفرد بیشتر از نوع متانولی آن است. در آزمون انتشار دیسک عصاره‌های گیاه گز قادر به مهار باکتری‌های مورد مطالعه در سطح معناداری یک درصد بودند(P *value*<0/01). البته شایان ذکر است که قابلیت مهاری عصاره‌های *T. hispida* بر باکتری *استرپتوکوکوس پنومونیه* در سطح ۵ درصد معنادار نیست (P *value*=0/086). بزرگترین هاله‌ی مهاری در آزمون یاد شده بر باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *کلبسیلا پنومونیه* تشکیل شد.

در محیط مایع نیز همانند محیط جامد به کار رفته در آزمون انتشار دیسک *کلبسیلا پنومونیه* بیش‌ترین و *استرپتوکوکوس پنومونیه* کم‌ترین حساسیت را به عصاره‌های گیاه گز نشان دادند.

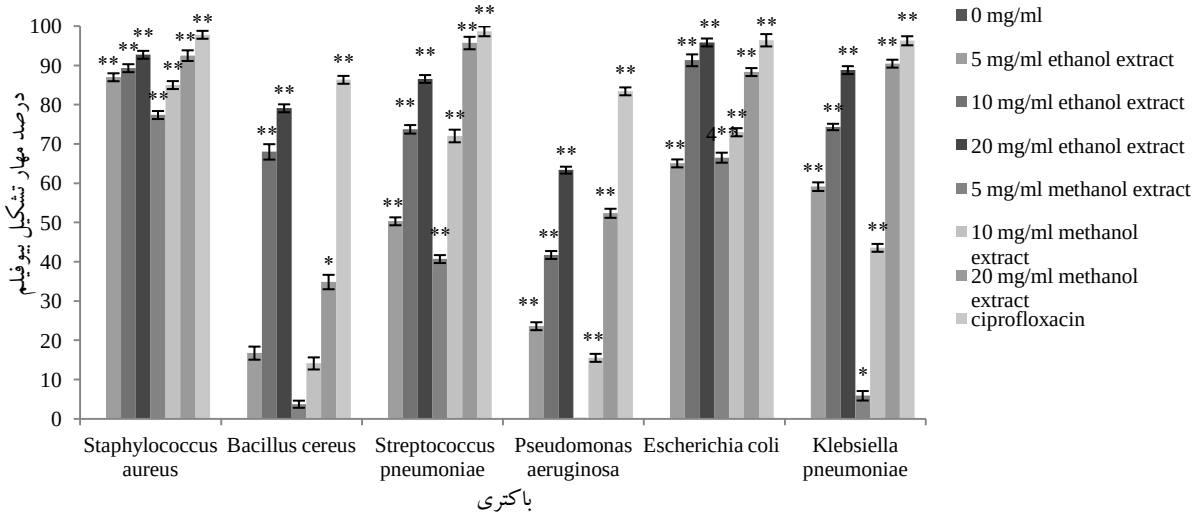


شکل ۱- مقایسه قطر هاله مهاری عصاره‌های گیاه گز و آنتی‌بیوتیک شاهد (میلی‌متر). حروف مشابه a, b, c, ... بر اساس آزمون دانکن با یکدیگر در سطح ۵ درصد اختلاف معنادار ندارند.

جدول ۱- مقادیر MIC و MBC عصاره‌های *T. hispida* (میلی گرم / میلی‌لیتر)

باکتری	MIC عصاره متانولی	MIC عصاره اتانولی	MBC عصاره متانولی	MBC عصاره اتانولی
استافیلوکوکوس اورئوس	۳/۱۲	۱/۵۶	۱۲/۵	۳/۱۲
باسیلوس سرئوس	۱/۵۶	۰/۷۸	۳/۱۲	۱/۵۶
استرپتوکوکوس پنومونیه	۶/۲۵	۳/۱۲	۲۵	۱۲/۵
سودوموناس آئروژینوزا	۳/۱۲	۰/۷۸	۱۲/۵	۳/۱۲
اشریشیا کلی	۳/۱۲	۱/۵۶	۶/۲۵	۶/۲۵
کلبسیلا پنومونیه	۰/۷۸	۰/۳۹	۱/۵۶	۰/۷۸

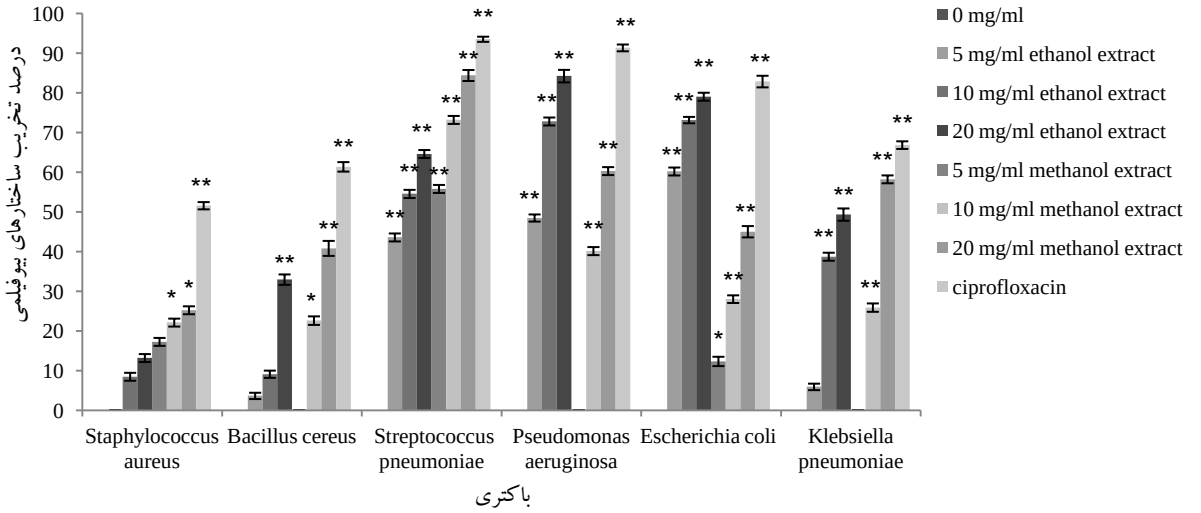
قابلیت عصاره‌های گیاهی در مهار ساختارهای بیوفیلمی باکتری‌های مورد بررسی: قدرت مهاری هریک از غلظت‌های انتخابی عصاره‌های *T. hispida* در مهار پدیده تشکیل بیوفیلم، تخریب ساختارهای بیوفیلمی و مهار فعالیت متابولیکی این ساختارها به ترتیب در شکل‌های ۲، ۳ و ۴ آمده است. با توجه به آزمون تحلیل واریانس انجام شده بر داده‌های آزمون‌های یاد شده، اثر مهاری عصاره‌های گیاه گزدر این آزمون‌ها در سطح یک درصد معنادار است (*P value* <0/01). بر این اساس در آزمون‌های مهار تشکیل بیوفیلم و مهار فعالیت متابولیکی ساختارهای یاد شده، نوع باکتری، نوع عصاره و غلظت بر قابلیت مهاری آن در سطح یک درصد نیز اثر معنادار بوده (*P value* <0/01) و آثار متقابل هریک از عوامل یاد شده نیز در سطح یک درصد معنادار است (*P value* <0/01). در تخریب ساختارهای بیوفیلمی تشکیل‌شده نیز تمامی عوامل یاد شده اثر معناداری بر قدرت مهاری عصاره در سطح یک درصد داشتند (*P value* <0/01). البته در آزمون یاد شده نوع عصاره (*P value* = 0/077)، اثر متقابل نوع عصاره و غلظت آن (*P value* = 0/144) که بر قدرت تخریبی عصاره‌ها در سطح ۵ درصد اثر معناداری نداشت.



شکل ۲- مقایسه اثر مهاری غلظت‌های متفاوت عصاره‌های الکلی گیاه گز بر تشکیل بیوفیلم باکتری‌های انتخابی

* نشان‌دهنده مهار معنادار غلظت مورد بررسی در سطح ۵ درصد و ** نشان‌دهنده مهار معنادار غلظت مورد بررسی در سطح یک درصد است.

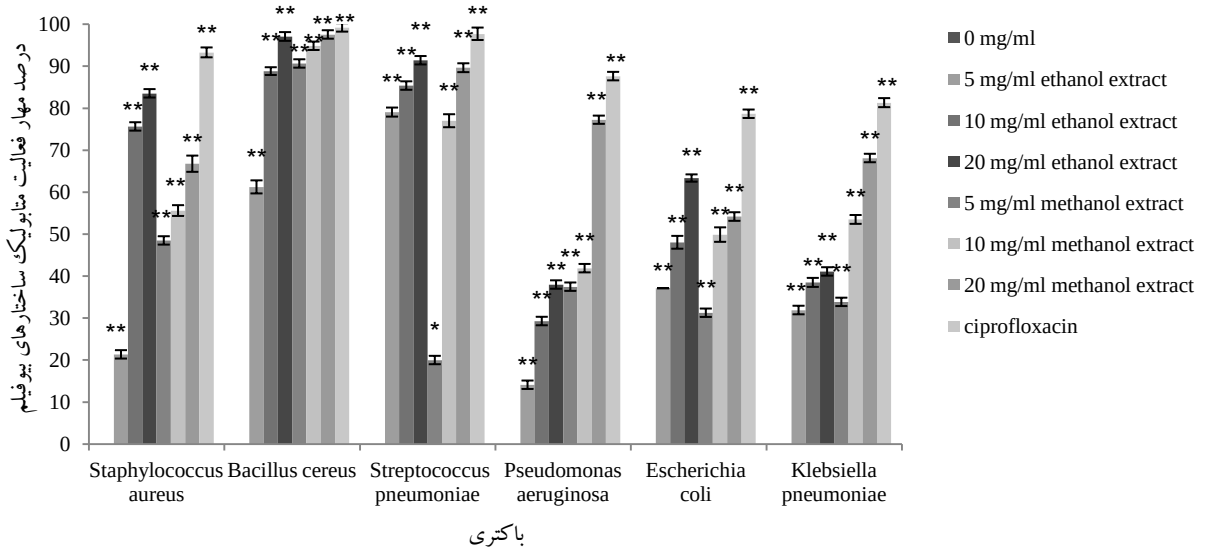
در بیشتر آزمون‌های انجام شده بر ساختارهای بیوفیلمی، اثر مهاری انواع اتانولی عصاره‌های *T. hispida* بیشتر از نوع متانولی آن بود. بر اساس میانگین قابلیت غلظت‌های مختلف عصاره در هریک از آزمون انجام شده بر ساختارهای بیوفیلمی، بیش‌ترین مهار پدیده تشکیل بیوفیلم در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* (۸۷/۳۵ درصد) مشاهده شد. با وجود این عصاره‌ی متانولی گیاه گز در غلظت ۵ میلی‌گرم / میلی‌لیتر قادر به مهار تشکیل بیوفیلم *سودوموناس آئروژینوزا* نبوده و عصاره *T. hispida* کم‌ترین اثر بخشی خود را درآزمون یاد شده بر باکتری‌های *باسیلوس سرئوس* و *سودوموناس آئروژینوزا* نشان داد.



شکل ۳- مقایسه قابلیت غلظت‌های متفاوت عصاره‌های الکلی گیاه گز در حذف ساختارهای بیوفیلمی باکتری‌های انتخابی

* نشان‌دهنده مهار معنادار غلظت مورد بررسی در سطح ۵ درصد و **نشان‌دهنده مهار معنادار غلظت مورد بررسی در سطح یک درصد است.

بیش‌ترین تخریب ساختارهای بیوفیلمی در تیمار با عصاره‌های *T. hispida* در *استرپتوکوکوس پنومونیه* (۶۲/۷۱ درصد) مشاهده شد. این در حالی است که نوع اتانولی عصاره‌ی گیاه گز در غلظت ۵ میلی‌گرم / میلی‌لیتر قادر به تخریب بیوفیلم‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* نبوده و نوع متانولی غلظت یاد شده بر تخریب ساختارهای بیوفیلمی *باسیلوس سرئوس*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *کلبسیلا پنومونیه* نیز بی‌اثر بود. فعالیت متابولیکی بیوفیلم‌ها نیز در تیمار با عصاره‌های *T. hispida* به حد درخور توجهی کاهش یافت که *باسیلوس سرئوس* بیش‌ترین کاهش (۸۸/۳۴ درصد) و *سودوموناس آئروژینوزا* کم‌ترین کاهش (۳۹/۶۴ درصد) را در این آزمون نشان دادند.



شکل ۴- مقایسه اثر غلظت‌های متفاوت عصاره‌های الکلی گیاه گز در مهار فعالیت متابولیک بیوفیلم باکتری‌های انتخابی

* نشان‌دهنده مهار معنادار غلظت مورد بررسی در سطح ۵ درصد و ** نشان‌دهنده مهار معنادار غلظت مورد بررسی در سطح یک درصد است.

بحث و نتیجه‌گیری

ظهور سویه‌های میکروبی مقاوم به دارو و گسترش روز افزون مقاومت‌های دارویی موجب شده تا مقابله با بیماری‌های عفونی امروزه به یکی از مشکلات اصلی حوزه درمان تبدیل شود. افزون بر این عوارض ناشی از مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها در بیماران و مشکلات زیست محیطی حاصل از این گروه دارویی همه سبب شده تا بررسی روش‌های جدید مقابله با سویه‌های میکروبی مقاوم بسیار مورد توجه پژوهشگران باشد. در این میان توجه ویژه به بیوفیلم‌های میکروبی به علت نقش مهمی که این ساختارها در بروز مقاومت‌های دارویی ایفا می‌کنند، بسیار ضروری است (۴ و ۱۹). بیوفیلم‌ها اجتماعاتی از سلول‌های میکروبی سازمان‌یافته در ماتریکسی از پلیمرهای خارج سلولی هستند که تشکیل این ساختارها بر سطوح مختلف موجب بروز مشکلات بسیاری در صنعت و پزشکی شده است (۱). در راستای دستیابی به ترکیبات جدید ضدمیکروبی، مشتقات زیستی و به ویژه گیاهان دارویی با توجه به مقبولیت عام و ماهیت طبیعی خود یکی از اصلی‌ترین انتخاب‌های پژوهشگران هستند (۵). از این‌رو در این مطالعه خواص

ضدمیکروبی *T. hispida* بر باکتری‌های انتخابی معین و مشخص شد چنانچه پس از عصاره‌گیری به روش ماسراسیون، تغلیظ انجام شود خاصیت مهاری عصاره افزایش چشمگیری خواهد داشت.

در آزمون انتشار دیسک قابلیت عصاره‌های *T. hispida* در مهار فرم منفرد باکتری‌های انتخابی تایید شد. اگرچه در آزمون یاد شده تنها در باکتری‌های *استرپتوکوکوس پنومونیه* و *کلبسیلا پنومونیه* قدرت مهاری عصاره برابر و حتی اندکی بیشتر از آنتی‌بیوتیک شاهد بود؛ هاله مهاری بسیار کوچکتری پیرامون دیسک‌های آغشته به عصاره بر کشت سایر باکتری‌ها در مقایسه با آنتی‌بیوتیک انتخابی مشاهده شد. در محیط مایع به کاررفته در آزمون MIC عصاره‌های *T. hispida* در غلظتی بسیار کمتر (۶/۲۵ تا ۰/۳۹ میلی‌گرم / میلی‌لیتر) از غلظت به کاررفته در تهیه دیسک (۱۰۰میلی‌گرم/ میلی‌لیتر) رشد باکتری‌های مورد بررسی را مهار کردند و از این‌رو قابلیت مهاری عصاره‌های گیاه گز در محیط مایع چندین برابر محیط جامد است. بنابراین، می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که ترکیبات موثر عصاره‌های *T. hispida* همانند بسیاری از عصاره‌های گیاهی دیگر قابلیت انتشاری اندکی در محیط جامد داشته و بر این اساس برای اثرگذاری مطلوب در این محیط به غلظتی بسیار بیشتر از غلظت موثر در محیط مایع نیاز است. در مقابله با ساختارهای بیوفیلمی نیز عصاره‌های *T. hispida* بسیار کارآمد بوده و اثر مهاری هر عصاره به غلظت و نوع حلال آن و همچنین، نوع باکتری مورد بررسی وابسته است. قابلیت عصاره‌های گیاه گزدر مهار پدیده تشکیل بیوفیلم باکتری‌های انتخابی بیشتر از قدرت تخریبی آن‌ها بود. البته شایان ذکر است که در *سودوموناس آئروژینوزا* قابلیت عصاره‌های یاد شده در تخریب ساختارهای بیوفیلمی بیشتر از قدرت مهاری آن‌ها در تشکیل بیوفیلم و یا سرکوب فعالیت متابولیکی این ساختارهاست. در این باکتری و همچنین، *استرپتوکوکوس پنومونیه* تفاوت محسوسی در قابلیت مهاری عصاره‌های *T. hispida* بر پدیده تشکیل بیوفیلم و مهار فعالیت متابولیکی ساختارهای یاد شده مشاهده نشد. در *باسیلوس سرئوس* عصاره‌های گز فعالیت متابولیکی ساختارهای بیوفیلمی را بهتر از پدیده تشکیل بیوفیلم مهار کردند. این در حالی است که در *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیا کلی* و *کلبسیلا پنومونیه* عکس پدیده یاد شده مشاهده شد. در میان باکتری‌های یاد شده تنها در *اشریشیا کلی* مهار فعالیت آنزیم دهیدروژناز سلول‌ها بسیار ضعیف‌تر از تخریب ساختارهای بیوفیلمی بوده و در دو باکتری دیگر عکس این پدیده مشاهده شد. با توجه به مکانیسم‌های متفاوت دخیل در تشکیل و گسترش بیوفیلم‌های هرکدام از باکتری‌های مورد مطالعه، مکانیسم‌های مهاری متفاوتی نیز از عصاره‌های *T. hispida* برای هر باکتری انتظار می‌رود. برای مثال عصاره‌های یاد شده ممکن است حاوی ترکیبات موثره‌ای باشند که با فرآیند تشکیل بیوفیلم به خوبی تداخل نموده اما قدرت تخریبی کمی بر این ساختارها داشته باشد. با توجه به اینکه ترکیبات موثره عصاره‌های گیاه گز و مکانیسم اثر مهاری آن‌ها بر ساختارهای بیوفیلمی در این مطالعه بررسی نشده و به مطالعات بعدی موکول شده است، می‌توان با شناسایی عناصر یاد شده و با توجه به مولکول‌های کلیدی متفاوت که در فرآیند تشکیل بیوفیلم باکتری‌های مورد مطالعه دخیل هستند، اختلافات مشاهده شده را تحلیل کرد.

در مطالعات دیگر نیز خواص ضدمیکروبی گونه‌های مختلف گیاه گز تایید شده که این بررسی‌ها بیشتر بر فرم منفرد باکتری‌ها بوده و تاکنون مطالعه‌ای برقابلیت گیاه گز در مهار ساختارهای بیوفیلمی انجام نشده است. برای مثال مشخص شده که فلاونوئیدهای مشتق از گونه *T. gallica* بر *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیا کلی*، *کلبسیلا پنومونیه*، *سودوموناس آئروژینوزا* و آسپرژیلوس نایجر اثر مهاری مناسبی دارد. در بررسی اشاره شده *سودوموناس آئروژینوزا* و *کلبسیلا پنومونیه* حساس‌ترین و *آسپرژیلوس نایجر* مقاوم‌ترین میکروارگانیسم‌ها به عصاره‌های *T. gallica* بوده و با افزایش غلظت عصاره قابلیت مهاری آن افزایش می‌یابد (۲۰). در بررسی دیگری که بر همین گونه از گیاه گز انجام شده مشخص شد که عصاره‌های آبی قدرت مهاری بیشتری نسبت به عصاره‌های متانولی داشته و عصاره‌های یاد شده اثر مهاری مناسبی بر فرم منفرد باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیا کلی*، *کلبسیلا پنومونیه*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *کاندیدا آلبیکنس* دارند (۲۱).

خواص ضد میکروبی گونه *T. aphylla* نیز بر میکروارگانیسم‌های مختلف تایید شده است. برای مثال در پژوهشی مشخص شده که عصاره‌های این گونه قابلیت مهاری مناسبی بر باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سوبتیلیس*، *اشریشیا کلی*، *پروتئوس میرابیلیس* و *پروتئوس ولگاریس* دارند اما اثر مهاری ضعیفی بر *سودوموناس آئروژینوزا* داشته و بر *سالمونلا تیفی* بی‌اثر هستند (۲۲). در مطالعه دیگری اثر ضدقارچی همین گونه از گیاه گز بر *آلترناریا* تایید شده است (۲۳). همچنین، پتانسیل ضد انگلی *T. Aphylla* بر *لیشمانیا تروپیکا* در بررسی دیگری تایید و مشخص شده است که قدرت مهاری گیاه یاد شده با غلظت عصاره به کاررفته و مدت زمان تیمار اثر مستقیم دارد (۲۴).

با توجه به نتایج حاصل در این پژوهش و بررسی‌های انجام شده بر گونه‌های مختلف گیاه گز، خواص ضدمیکروبی این گیاه تایید شده و عصاره‌های آن گزینه‌های مناسبی در مهار میکروارگانیسم‌های پاتوژن هستند. از آن‌جا که عصاره‌های الکلی *T. hispida* در این بررسی اثر مهاری مناسبی بر فرم منفرد و ساختارهای بیوفیلمی باکتری‌های مورد مطالعه در شرایط آزمایشگاهی نشان دادند، مطالعات بیشتر بر خواص ضدبیوفیلمی گیاه گز توصیه می‌شود. به علاوه می‌توان با بررسی و تخلیص ترکیبات موثره عصاره‌های *T. hispida* و همچنین، سنجش میزان اثربخشی این عصاره‌ها در حیوانات آزمایشگاهی از عصاره‌های یاد شده به عنوان یک منبع ضدمیکروبی مناسب در مقابله با میکروارگانیسم‌های پاتوژن، به ویژه در شکل بیوفیلمی بهره گرفت.

References

(1) Thomas JG., Posey SP. Emergence of oral/dental microbiology. *Advence Aministrationon Laboratory* 2009; 18 (6): 35- 8.

(2) Sutherland IW. Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria. *International Daily Journal* 2001; 11 (1): 663- 74.

(3) Kavanaugh NL., Ribbeck K. Selected antimicrobial essential oils eradicate *Pseudomonas* spp. and *Staphylococcus aureus* Biofilms. *Applied Environmental Micobiology* 2012; 78 (11): 4057- 61.

(4) Horiuchi K., Shiota S., Hatano T., Yoshida T., Kuroda T., Tsuchiya T. Antimicrobial activity of oleanolic acid from *Salviaofficinalis* and related compounds on vancomycin- resistant *enterococci* (VRE). *Biological Pharmacology Bulletin* 2007; 30 (6):1147-9.

(5) Das K., Tiwari RKS. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends. *Journal Medical Plant Research* 4 (2): 104- 11.

(6) Ahi EA. *Pharmacological plant biology*. 3th ed. Mashhad: Mashhad University of Medical Sciences; 2012. P25-45. [In Persian].

(7) Mohammed Hassan KA., Eltayb N. Eucalyptus oil as a treatment for acne. *International Journal Advence Pharmacology Science* 2013; 4 (4): 557- 66.

(8) Khan S., Khan GM., Mehsud S., Rahman A., Khan F. Antifungal activity of *Tamarixdioica* an in vitro study. *Gomal Journal Medical Science* 2004; 2 (2): 40- 2.

(9) Al- Shamma AA., Kadhum EJ., Al- Hiti MA. Antimicrobial activity and phytochemical investigation of *Tamarixmacrocarpa* (Ehrenb.) bge wildly grown in Iraq. *Medical Plants* 2005; 29 (1): 99- 104.

(10) Forbes BA., Sahm DF., Weissfeld AS., Trevino EA. Methods for testing antimicrobial effectiveness. In: Baron EJ., Peterson LR., Finegold SM., editors. *Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology*. 8th ed. Missouri: Mosby Company; 1990. p 171-94.

(11) Androw JM. Standardized disc susceptibility testing method. *Journal Antimicrobial Chemistry* 2001; 25 (1): 48-57.

(12) Bauer AW., Kirby WM., Sherris JC., Truck N. Antimicrobial susceptibility testing by a standardized single disk method. *America Journal of Clinical Pathology* 1996; 45 (4): 493- 6.

(13) Vanden DA., Vlietinck AJ. In: Dey PM., Harborne JB., editors. *Methods in plant biochemistry: Screening medthods for antibacterial and antiviral agents from higher plants*. 5th ed. London: Academic press; 1991. p 47- 69.

(14) Cramton SE., Gerke C., Cotz F. In vitro methods to study biofilm formation. *Method Enzymology* 2001; 336 (1): 239–55.

(15) Jabra- Rizk MA., Meiller TF., James CE., Shirtliff ME. Effect of Farnesol on *Staphylococcus aureus* biofilm formation and antimicrobial susceptibility. *Journal of Antimicrobial Agents* 2006; 50 (4): 1463- 9.

(16) Mahdavi M., KasraKermanshahi R., Jalali M. The assessment of disinfectants on various bacterial biofilms. *Research Journal of University of Isfahan "SCI"* 2006; 31 (2): 35- 46. [In Persian].

(17) Sandasi M. The effect of plant extraction on microbial biofilm formation and development [Dissertation]. Tshwane: Univ. Technol.; 2008.

(18) Lazarova V., Pierzo V., Fontvielle D., Manem J. Integrated approach for biofilm characterization and biomass activity control. *Water Science Technology* 1994; 29 (7): 345–54.

(19) Myszka K., Czaczyk K. Bacterial biofilms on food contact surfaces – a review. *Polish Journal Food Nutrient Science* 2011; 61 (3): 173- 80.

(20) Lefahal M., Benahmed M., Louaar S., Zallagui A., Duddeck H., Medjroubi K., et al. Antimicrobial activity of *Tamarixgallica* L. extracts and isolated flavonoids. *Advence Natural Applied Science* 2010; 4 (3): 289-92.

(21) Zaouia K., Segni L., Noureddine G., Redha OM. Antimicrobial activity of nine medicinal plants growing in the south of Algeria. *Annal Biology Research* 2010; 1 (4): 145- 47.

(22) Zain ME., Awaad AS., Al- Outhman MR., El- Meligy RM. Antimicrobial activities of Saudi Arabian desert plants. *Phytopharmcology* 2012; 2 (1): 106- 13.

(23) Ahmad N., Amir MK., Ayaz S., Ahmad S., Jan A., Ashraf JS., et al. Antimicrobial profile of the selected medicinal plants. *Int Journal Chemistry Life Science* 2012; 1 (2): 1039- 41.

(24) Iqbal H., Khattak B., Ayaz S., Rehman A., Ishfaq M., Abbas MN., et al. Comparative efficacy of *Aloevera* and *Tamarixaphylla* against Cutaneous Leishmaniasis. *International Journal Basic Medical Science Pharmcology* 2012; 2 (2): 42- 5.

[1]- Nutrient broth, NB
[2]- 0.5 Mac farland
[3]- Muller Hinton Agar, MHA
[4]- Minimum Inhibitory Concentration, MIC
[5]- The Clinical and Laboratory Standards Institute
[6]- Minimum Bactericidal Concentration, MBC
[7]- Tryptic Soy Broth, TSB
[8]- Sandasi
[9]- TriphenylTetrazolium Chloride
[10]- ANOVA
[11]- SPSS
[12]- *P value*
[13]- Duncan
[14]- LSD

Inhibitory effects of *Tamarix hispida* extracts on planktonic form and biofilm formation of six pathogenic bacteria

Zeynab Mohsenipour
M.Sc. of Microbiology, Shahid Bahonar University of Kerman, Iran, mohsenipourz20@gmail.com
Mehdi Hassanshahian *
Assistant Professor of Microbiology, Shahid Bahonar University of Kerman, Iran, hasanshahi@gmail.com

Abstract

Introduction: Biofilms are communities of microorganisms embedded in a self-produced extracellular polymeric matrix. Bacterial cells are protected from antimicrobial agents in biofilm structure. Biofilms formation cause many problems in industry, medicine and microbial drug resistance; thus it is essential to find new techniques for removing and inhibiting biofilms. This study aimed to examine the antimicrobial effect of *Tamarix hispida* alcoholic extracts against six pathogenic bacteria in planktonic and biofim forms.

Materials and methods: Antimicrobial activities of the plant extracts against the planktonic form of bacteria were evaluated by using the disc diffusion method. MIC and MBC values were determined by a macrobroth dilution technique. Anti-biofilm effects were assessed by microtiter plate method.

Results: The results of this study confirmed high ability of *T. hispida* extracts against the biofilm of tested bacteria and their free-living forms. Methanolic extracts better inhibited bacterial growth and biofilm formation than ethanolic extracts. Anti-biofilm effects of plant extracts were depended on the solvent and extract concentration. The maximum inhibitory effects of *T. hispida* extracts on biofilm formation, demolish of biofilm structure and inhibition of metabolic activity of bacteria in the biofilm were observed for *S. aureus* (87/35 %), *S. pneumonia* (74/49 %) and *B. ceruse* (88/34 %) respectively.

Discussion and conclusion: In this study the capacity of herbal extracts to encountering whit biofilm was demonstrated and it was confirmed that these extracts have interesting potentiality to become active agents of new drugs.

Key words: Biofilm, *Tamarix hispida*, Drug resistant, Pathogenic bacteria, Antimicrobial effect

* Corresponding author
Received: January 13, 2014 / **Accepted:** March 15, 2014