

اثر عصاره متانولی بولاغ اوتی (*Nasturtium officinale*)

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

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی - تحلیلی عصاره‌گیری گیاه بولاغ اوتی با روش خیساندن در متانول ۸۰ درصد، به وسیله دستگاه روتاری اوپراتور انجام شد. حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره بولاغ اوتی علیه پ سودوموناس آئروژینوزا با روش میکرودیالوژن برات تعیین شد. تشکیل بیوفیلیم با روش میکروتیتر پلیت و رنگ آمیزی با کریستال ویوله بررسی گردید.

یافته‌ها: حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره متانولی بولاغ اوتی علیه پ سودوموناس آئروژینوزا ۰/۶۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و حداقل غلظت کشندگی این عصاره ۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. سویه PAOI و ۵ سویه بالینی، قادر به تشکیل بیوفیلیم بودند. مهار تشکیل بیوفیلیم توسط عصاره گیاه بولاغ اوتی به غلظت وابسته بود. بیشترین درصد مهار تشکیل بیوفیلیم در غلظت ۷/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و کمترین درصد مهار تشکیل بیوفیلیم در غلظت ۰/۱۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. میانگین مهار تشکیل بیوفیلیم پ سودوموناس آئروژینوزا توسط عصاره بولاغ اوتی ۲۲/۲۷±۷۲/۶۹ درصد به دست آمد. در غلظت‌های ۰/۹۳، ۰/۴۶، ۰/۲۳ و ۰/۱۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اختلاف معنی‌داری بین سویه‌های بالینی و سویه PAOI مشاهده شد ($P < 0/05$).

نتیجه‌گیری: عصاره متانولی گیاه بولاغ اوتی دارای اثر ضد باکتریایی و ضد بیوفیلیمی علیه پ سودوموناس آئروژینوزا بود.

کلید واژه‌ها: گیاه بولاغ اوتی، پ سودوموناس آئروژینوزا، بیوفیلیم، حداقل غلظت مهارکنندگی

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

نشانی: یاسوج، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، دانشکده پزشکی، تلفن ۳۱-۳۳۳۳۷۲۳۰-۰۷۴، شماره ۳۳۳۳۷۲۳۰

وصول مقاله: ۱۳۹۶/۲/۱۹، اصلاح نهایی: ۱۳۹۶/۴/۱۴، پذیرش مقاله: ۱۳۹۶/۵/۳۱

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

مقدمه

برابر بسیاری از ضد عفونی کننده‌ها و آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله پنی‌سیلین‌های ضد پ سودوموناس، سفتازیدیم، کارباپنیم‌ها، آمینو گلیکوزیدها و سیپروفلوکساسین مقاوم است (۳). یک تغییر به حالت بیوفیلیم باعث افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی و ایجاد یک عفونت شدید و قابل توجه در ریه بیماران دارای سیستمیک فیروزیس می‌شود (۴). موفقیت پ سودوموناس آئروژینوزا به عنوان یک پاتوژن فرصت طلب به علت تطبیق پذیری و سازگاری و تنوع است که به وسیله ژنوم کد گذاری شده است. ژنوم باکتری پ سودوموناس آئروژینوزا در مقایسه با سایر باکتری‌های بیماری‌زا بزرگ تر است. برای سویه استاندارد PAOI پ سودوموناس آئروژینوزا تعداد ۵۲۱ ژن بیماری‌زا و ۱۶۸ بیماری‌پیش‌بینی شده است (۵).

جنس پ سودوموناس بیش از ۱۲۰ گونه است و در همه جا از جمله محیط‌های مرطوب وجود دارد (۱). پ سودوموناس آئروژینوزا یک پاتوژن انسانی فرصت طلب است که می‌تواند در محیط‌های متنوع طبیعی و بیمارستانی رشد کند. عفونت پ سودوموناس آئروژینوزا در افراد سالم نادر است؛ اما در افراد در معرض خطر مانند بیماران مبتلا به فیروز 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 پ سودوموناس آئروژینوزا دیده می‌شود (۲). پ سودوموناس آئروژینوزا یک پاتوژن فرصت طلب است که در

است. گیاه بولاغ اوتی دارای ترکیبات گلوکوناستورتین و ویتامین های A، C و E و نیز دارای فلاونوئیدهای مهمی از جمله لوتین و کوئرستین است. گیاه بولاغ اوتی در کاهش قندخون بالا، چربی خون بالا، فشارخون بالا و بیماری های 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 می روید. این گیاه دارای بتاکاروتن، اسید اسکوربیک، کلسیم، اسید فولیک، آهن، فسفر، ید و اسیدهای آمینه بوده و در مهار رشد سلول های سرطانی ریه مؤثر است. گیاه بولاغ اوتی به خاطر مدر بودن در بیماری های کلیه و مجاری ادرار مورد استفاده قرار می گیرد (۱۳). گیاه بولاغ اوتی توسط مردم روستایی برای تغذیه، ضدالتهاب و آنتی اکسیدان استفاده می شود 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 می شود (۱۴). در مطالعات انجام شده نیز اثر ضد میکروبی گیاه بولاغ اوتی ثابت شده است (۱۴ و ۱۵). 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 میکروبی شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج در سال ۱۳۹۵ انجام شد.

برای نمونه گیری ابتدا با مراجعه به آزمایشگاه های شهر یاسوج، تعداد ۱۰ نمونه بالینی *پسودوموناس آئروژینوزا* جمع آوری و در حداقل زمان ممکن به آزمایشگاه میکروبی شناسی انتقال داده شد. علاوه بر نمونه های بالینی از نمونه استاندارد PAOI *پسودوموناس آئروژینوزا* استفاده شد.

برای تأیید مجدد سوبه ها از تست های بیوشیمیایی از جمله تست اکسیداز، کاتالاز، Oxidative Fermentative، تولید پیگمان و رنگ آمیزی گرم استفاده شد.

گیاه بولاغ اوتی در یکی از چشمه های آب شهر یاسوج جمع آوری 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 سی سی 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 به وسیله دستگاه پمپ خلاء و دستگاه Rotary evaporator عصاره گیری انجام شد و عصاره به دست آمده پس از خشک شدن در یخچال نگهداری شد.

پسودوموناس آئروژینوزا به دلیل نفوذپذیری کم در غشای خارجی که به عنوان یک سد انتخابی عمل می کند؛ باعث مقاومت ذاتی نسبت به آنتی بیوتیک های مختلف می شود. به طوری که ظهور مقاومت به آنتی بیوتیک در بیماران فیروز کیستیک گزارش شده است (۱). مکانیسم های مقاومت در *پسودوموناس آئروژینوزا* شامل پمپ های جریان، نفوذپذیری غشای خارجی، بتالاکتاماز، جهش، انتقال افقی و تغییرات غشایی است (۱ و ۵).

در طبیعت باکتری ها به دو نوع فرم پلانکتونیک و بیوفیلم مشاهده می شوند. بیوفیلم اجتماع پیچیده باکتری است که در یک پوشش گلیکو کالیکس احاطه شده و به سطوح مخاطی متصل می شود. تشکیل بیوفیلم توسط *پسودوموناس آئروژینوزا* در راه تنفسی بیماران فیروز کیستیک، پنومونی و بیماران ریوی مزمن یکی از علت های مهم در طولانی شدن درمان، تشدید علائم بالینی و حتی مرگ بیماران است (۶). همچنین تشکیل بیوفیلم یک حالت محافظ رشد میکروارگانیزم است که اجازه می دهد میکروارگانیزم در میزبان و محیط زنده بماند. بیوفیلم می تواند بر روی انواع سطوح تشکیل شود و در محیط های 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 سلول های 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 پلی و فلاژلا در این کار نقش دارند (۹). بیوفیلم ناشی از میکروارگانیزم های بیماری زا نقش مهمی را در سلامت انسان بازی می کند و به دلیل مقاومت آنها در برابر مواد شوینده و عوامل ضد میکروبی به سختی به درمان پاسخ می دهند. بر اساس تخمین مؤسسه ملی بهداشت، بیوفیلم بیش از ۶۵ درصد عفونت های بیمارستانی و تا ۷۵ درصد عفونت های میکروبی در بدن انسان را شامل می شود. بیوفیلم ناشی از میکروارگانیزم های بیماری زا بر روی ابزار پزشکی و ایمپلنت مانند کاتتر، دریچه های مصنوعی قلب، لنزهای تماسی و مفاصل مصنوعی نیز تشکیل می شود (۱۰).

از سوی دیگر افزایش بی رویه در استفاده از آنتی بیوتیک ها در مراکز بهداشتی درمانی و یا به وسیله افرادی که خودسرانه دارو تجویز می کنند؛ می تواند مستعد بیماری های عفونی به وسیله میکروارگانیزم های مقاوم به چند دارو شود. در این میان شناسایی و ارزیابی ترکیبات ضد میکروبی موجود در عصاره گیاهان دارویی به عنوان یک منبع جدید دارویی و یک روش درمان جایگزین یک راه حل 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

برای بررسی اثر عصاره متانولی این گیاه بر روی تشکیل بیوفیلم پسدوموناس آئروژینوزا از روش میکرو تیترا پلیت و رنگ آمیزی با کریستال ویوله ۰/۱ درصد استفاده شد (۱۶ و ۲۰). برای این کار ابتدا در هر کدام از چاهک‌های پلیت ۹۶ چاهکی مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر محیط کشت مولر هیتون براث ریخته شد و در تمام چاهک‌های ستون اول به جز چاهک‌های کنترل منفی مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر از عصاره آماده شده با غلظت اولیه ۳۰ میلی گرم بر میلی لیتر (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 میکرو لیتر بود؛ اما برای بررسی بیوفیلم حجم نهایی هر چاهک ۲۰۰ میکرو لیتر بود. در مرحله بعد ۱۰۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون رقیق شده با کتری با رقت CFU/ML $10^6 \times 2$ به تمام چاهک‌ها (بجز چاهک‌های کنترل منفی) اضافه شد. به طوری که در نهایت غلظت باکتری هر چاهک معادل CFU/ML 10^6 بود. بنابراین چاهک‌های کنترل مثبت شامل ۱۰۰ میکرو لیتر محیط کشت و ۱۰۰ میکرو لیتر سوسپانسیون باکتری بود و هیچگونه عصاره‌ای در آنها وجود نداشت. در چاهک‌های کنترل منفی فقط ۲۰۰ میکرو لیتر 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 سانتی گراد 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 میکرو تیترا پلیت در دمای اتاق خشک گردید و به هر کدام از چاهک‌ها ۲۰۰ میکرو لیتر 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 میکرو لیتر 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 میکرو لیتر 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 پسدوموناس آئروژینوزا بر اساس فرمول زیر محاسبه شد (۱۶ و ۲۰).

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

ODC: جذب نوری چاهک کنترل مثبت

ODB: جذب نوری چاهک بلانک (کنترل منفی)

ODT: جذب نوری چاهک تیمار با عصاره گیاه بولاغ اوتی

(۱۶). برای تهیه غلظت مورد نیاز از عصاره گیاه بولاغ اوتی به منظور تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی (Minimum Inhibitory Concentration: MIC)، مقدار ۰/۰۲ گرم از عصاره به وسیله ترازو وزن شد و سپس در یک سی سی از دی متیل سولفو کساید حل و با استفاده از فیلتر میلی پور ۰/۲۲ میکرون استریل شد و به عنوان محلول ذخیره (۲۰ میلی گرم بر میلی لیتر) تا زمان مصرف در ظرف شیشه‌ای استریل و تیره در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد (۱۶). برای تهیه غلظت مورد نیاز از عصاره برای بررسی مهار بیوفیلم، ابتدا مقدار ۰/۰۳ گرم از عصاره به وسیله ترازو وزن شد و در یک سی سی از دی متیل سولفو کساید حل و با استفاده از فیلتر میلی پور ۰/۲۲ میکرون استریل شد و به عنوان محلول ذخیره (۳۰ میلی گرم بر میلی لیتر) تا زمان مصرف در ظرف شیشه‌ای استریل و تیره در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد (۱۶). برای تعیین MIC از روش میکرو دیالوژن براث استفاده گردید (۱۶ و ۱۷). به این ترتیب که ابتدا در هر کدام از چاهک‌های پلیت ۹۶ چاهکی مقدار ۹۵ میکرو لیتر محیط کشت مولر هیتون براث ریخته شد. در ردیف‌های کنترل منفی (بلانک) ۱۰۰ میکرو لیتر محیط کشت ریخته شد. سپس در تمام چاهک‌های ستون اول ۱۰۰ میکرو لیتر از عصاره تهیه شده (در سه تکرار) اضافه شد. بعد از این مرحله محتویات اولین چاهک ردیف اول با سمپلر به خوبی مخلوط شد. سپس ۱۰۰ میکرو لیتر 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 میکرو لیتر 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 میلی لیتر بود. در مرحله بعد سوسپانسیون میکروبی معادل نیم مک فارلند به رقت CFU/ML 1×10^7 رسانده شد و در تمام چاهک‌ها به جز چاهک‌های بلانک (کنترل منفی)، مقدار ۵ میکرو لیتر از سوسپانسیون باکتری با رقت CFU/ML 1×10^7 ریخته شد که در نهایت غلظت باکتری هر چاهک CFU/ML 5×10^5 شد. در مرحله بعد پلیت ۹۶ چاهکی به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد 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 میکرو لیتر 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 سانتی گراد در آنکوباتور قرار گرفت. بعد از این مدت کمترین غلظت از عصاره که مانع رشد باکتری شده بود؛ به عنوان MBC در نظر گرفته شد (۱۶ و ۱۸ و ۱۹).

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 (میلی گرم بر میلی لیتر)	حداقل غلظت کشندگی (میلی گرم بر میلی لیتر)
استاندارد	۰/۶۲۵	۱/۲۵
۱ بالینی	۱/۲۵	۱/۲۵
۲ بالینی	۰/۶۲۵	۲/۵
۳ بالینی	۱/۲۵	۲/۵
۴ بالینی	۰/۶۲۵	۱/۲۵
۵ بالینی	۰/۶۲۵	۲/۵
۶ 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	۷/۵	۳/۷۵	۱/۸۷	۰/۹۳	۰/۴۶	۰/۲۳	۰/۱۱
استاندارد	۱۰۰	۹۳	۹۰/۶	۳۹/۵	۲۴/۴	۲۴/۴	۲۲
۲ بالینی	۹۶/۵	۹۴/۶	۹۴	۹۲/۷	۶۶/۹	۶۳/۹	۵۵/۶
۵ بالینی	۹۶/۴	۹۶/۱	۹۵/۲	۹۳/۳	۶۱/۱	۵۴/۱	۴۴/۵
۷ بالینی	۹۵/۸	۹۴/۴	۹۲/۵	۷۳/۹	۷۰/۶	۶۰/۴	۵۱/۱
۸ بالینی	۹۸/۱	۹۰/۸	۷۹/۸	۷۸/۸	۷۶/۱	۷۴/۳	۶۵/۱
۱۰ بالینی	۹۳/۲	۶۹/۶	۶۷/۴	۶۲/۹	۵۸/۴	۵۱/۶	۴۹/۴
میانگین	۹۶/۶۶±۲/۲	۸۹/۷۵±۱/۰	۸۶/۵۸±۱۰/۹	۷۳/۵۱±۲۰/۲	۵۹/۵۸±۱۸/۳	۵۴/۷۸±۱۶/۹	۴۷/۹۵±۱۴/۴

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

پسودوموناس آئروژینوزا دارای اثر ضد بیوفیلمی علیه این باکتری نیز هست. عصاره متانولی گیاه بولاغ اوتی به‌طور میانگین $72/69 \pm 22/27$ درصد تشکیل بیوفیلم سویه‌های بالینی و سویه استاندارد PAOI 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 میلی گرم بر میلی لیتر و کمترین درصد مهار تشکیل بیوفیلم در غلظت ۰/۱۱ میلی گرم بر میلی لیتر تعیین شد. در یک مقایسه کلی بین تمام غلظت‌های عصاره متانولی بولاغ اوتی علیه سویه‌های بالینی و سویه استاندارد PAOI پسودوموناس آئروژینوزا، اختلاف آماری معنی‌داری بین سویه‌های بالینی و سویه استاندارد PAOI پسودوموناس آئروژینوزا یافت نشد؛ اما مقایسه سویه‌های بالینی و سویه استاندارد PAOI 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 میلی گرم بر میلی لیتر بین سویه‌های بالینی و سویه استاندارد PAOI نشان داد ($P < 0/05$).

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

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 معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

عصاره گیاه بولاغ اوتی دارای اثر مهار کنندگی و اثر کشندگی علیه سویه‌های بالینی و سویه استاندارد PAOI پسودوموناس آئروژینوزا بود. حداقل غلظت مهار کنندگی عصاره بولاغ اوتی علیه پسودوموناس آئروژینوزا ۰/۶۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر و حداقل غلظت کشندگی این عصاره علیه پسودوموناس آئروژینوزا ۱/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر 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 PAOI پسودوموناس آئروژینوزا با روش میکرو تیترا پلِت و رنگ آمیزی 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

بحث

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

مطالعات قبلی نیز تأییدکننده خواص ضدباکتریایی این گیاه است. به عنوان مثال در مطالعه Magno و Penecilla که روی فعالیت ضد میکروبی 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 پseudomonas آئروژینوزا دارند (۱۵). در مطالعه حاضر نیز عصاره متانولی گیاه بولاغ اوتی دارای اثر ضدباکتریایی علیه پseudomonas آئروژینوزا بود. در مطالعه Freitas و همکاران فعالیت ضدباکتریایی و اثر هم افزایی بین عصاره بولاغ اوتی و ۲- فناتیل ایزوتیوسیانات و آنتی بیوتیک در برابر یازده سویه از باکتری اشریشیاکلی از منابع انسانی حیوانی مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد در صورتی که آنتی بیوتیک با عصاره گیاه بولاغ اوتی ترکیب شود؛ فعالیت ضد میکروبی آنتی بیوتیک افزایش می یابد (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 میلی متر است. همچنین نرخ مهار رشد به غلظت وابسته بود. به طوری که عصاره الکلی بولاغ اوتی توانست رشد میسلیم قارچ (*Fusarium solani*) را بر اساس وابسته بودن به دوز مهار کند (۱۴). در مطالعه حاضر نیز عصاره متانولی بولاغ اوتی علیه پseudomonas آئروژینوزا اثر بازدارندگی رشد و اثر کشندگی داشت. علاوه بر این مهار تشکیل بیوفیلم پseudomonas آئروژینوزا به غلظت عصاره وابسته بود.

در مطالعه Abdul و همکاران فعالیت آنتی اکسیدانی، محتوای فنلی و فعالیت ضد میکروبی گیاه بولاغ اوتی بررسی شد. عصاره متانولی بولاغ اوتی علیه باکتری‌ها (B.PU, E.coli, S.au, B.Ce, KLb,) و قارچ‌ها (E.NT, B.sub, St.Ep, PS) دارای اثر

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

ضدمیکروبی بود (۲۲). مطالعه حاضر نیز نشان داد که عصاره متانولی بولاغ اوتی دارای اثر ضد میکروبی علیه پseudomonas آئروژینوزا است.

در رابطه با اثر عصاره گیاه بولاغ اوتی بر روی تشکیل بیوفیلم پseudomonas 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 پseudomonas آئروژینوزا مشخص شد و همچنین سایر مطالعات انجام شده در گذشته تأییدکننده 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 آنتی بیوتیک‌ها برای مقابله با مقاومت‌های آنتی بیوتیکی 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 پseudomonas 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 پseudomonas آئروژینوزا مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک‌ها را افزایش می دهد؛ احتمالاً در آینده با مطالعات بیشتر بر روی عصاره گیاه بولاغ اوتی بتوان از آن به عنوان مکمل درمانی همراه آنتی بیوتیک‌ها استفاده نمود.

نتیجه گیری

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

تشکر و قدردانی

این مطالعه حاصل پایان نامه (کد ۱۲۰۳۰۵۰۷۹۴۲۰۰۸) آقای آرین امیدی برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته میکروبیولوژی از دانشگاه آزاد اسلامی واحد یاسوج بود. بدین وسیله از دانشگاه آزاد اسلامی واحد یاسوج، دانشکده پزشکی یاسوج، کارشناسان آزمایشگاه میکروب‌شناسی خانم راضیه محسنی و خانم مرضیه طاهری پور تشکر و قدردانی می شود.

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*

- sensing-controlled virulence factor 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. Ruhál R, Antti H, Rzhepishevská 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, ejková 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, Legendijk 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. 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 Rafsanjan Univ 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. Omid 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. Bokaieian 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.

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

¹M.Sc in Microbiology, Young Researchers and Elite Club, Yasooj Branch, Islamic Azad University, Yasooj, Iran.

²Associate Professor, Cellular and Molecular Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran.

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>)