

## ORIGINAL RESEARCH

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

Elham Pishgar<sup>1\*</sup> , Milad Makhfian<sup>2</sup> 

1. Department of Microbiology, Islamic Azad University of Jahrom, Fars, Iran.

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

#### ARTICLE INFORMATION

##### Article history

**Received:** 05 December 2018

**Accepted:** 30 January 2019

**Published online:** 10 June 2019

##### Keywords

*Agrobacterium*

AHL

Anti-quorum sensing

Biofilm

QS

Raspberry

*Staphylococcus aureus*

##### \* Corresponding Author:

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

**Fax:** +98 71 5422 6889

**Email:** [elhampishgar1504@gmail.com](mailto:elhampishgar1504@gmail.com)

#### ABSTRACT

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

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

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

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

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

© Copyright (2019) Arak University of Medical Sciences

Use your device to scan  
and read this article online:



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



# JAMS

مجله دانشگاه علوم پزشکی اراک

دوره بیست و دو، شماره دو، خرداد و تیر ۱۳۹۸

journal homepage: <http://jams.arakmu.ac.ir>



مقاله پژوهشی

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

الهام پیشگر<sup>۱\*</sup>، میلاد مخفیان<sup>۲</sup>

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

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

### چکیده

زمینه و هدف: بسیاری از باکتری‌ها به ویژه استافیلوکوکوس اورئوس از مکانیسم حساسیت جمعیتی برای انجام بسیاری از فعالیت‌های ضروری خود مانند تولید بیوفیلیم و ایجاد فاکتورهای بیماری‌زایی استفاده می‌کنند. هرگونه تداخل در این سیستم باعث ناتوانی باکتری در انجام فعالیت‌های فوق خواهد شد. این مطالعه با هدف ارزیابی پتانسیل ۵ عصاره گیاهی علیه حساسیت جمعیتی سویه ۱. اورئوس انجام گردید.

**مواد و روش‌ها:** سیزده جدایه ۱. اورئوس از بیماران دچار عفونت ایمپلنت دندان‌سازی و شناسایی شدند. گونه‌های گیاهی از باغات استان فارس جمع آوری و عصاره گیری به واسطه حلال اتانول ۹۶ درصد انجام پذیرفت. اثر عصاره گیاهان به واسطه سویه نشان‌گر آگروباکتریوم تومی فشنس 4/NTL/PZLR، با آزمون ضدحساسیت جمعیتی و هم‌چنین خاصیت باکتری‌کشی با آزمون ضد میکروبی مورد بررسی قرار گرفت. در ضمن قدرت تولید بیوفیلیم جدایه‌ها به روش میکروتیتربلیت (MTP) ارزیابی گردید.

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

**یافته‌ها:** نتایج نشان داد که عصاره شکوفه تمشک به‌صورت معنی داری ( $p < 0.05$ ) خاصیت ضد حساسیت جمعیتی دارد ( $< 21$  میلی‌متر). ایجاد هاله روشن در اطراف چاهک توسط سویه نشان‌گر، اثرات ضد حساسیت جمعیتی عصاره شکوفه تمشک را تأیید نمود. عصاره گیاهان ترخون، گل‌گندم، خاکشیر و ریحان صرفاً خاصیت ضد میکروبی از خود نشان دادند.

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

### اطلاعات مقاله

تاریخ دریافت: ۹۷/۰۹/۱۴

تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۱/۱۰

تاریخ انتشار: ۹۸/۰۳/۲۰

### واژگان کلیدی

آگروباکتریوم

استافیلوکوکوس اورئوس

بیوفیلیم

تمشک

ضد حساسیت جمعیتی

AHL

QS

\* نویسنده مسئول:

الهام پیشگر

آدرس پستی: ایران، استان فارس، جهرم، ۱۵

کیلومتری جاده جهرم-شیراز، مجتمع دانشگاهی

امام مهدی (عج)، دانشگاه آزاد اسلامی جهرم،

کد پستی: ۷۴۱۴۷۸۵۳۱۸.

نمابر: +98 71 5422 6889

E-mail:

elhampishgar1504@gmail.com



استفاده از گیاهان دارویی در راستای درمان و پیشگیری از عفونت‌هایی با منشا باکتریایی مورد بررسی قرار گرفت.

## ۲. ملاحظات اخلاقی

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

## ۳. مواد و روش‌ها

سویه‌های باکتریایی و محیط‌های کشت

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

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

این مطالعه با هدف بررسی پتانسیل بازدارندگی ویژگی حساسیت جمعیتی عصاره‌های شکوفه تمشک، ترخون، گل گندم، خاکشیر و ریحان با کمک سویه گزارشگر *آگروباکتریوم تومی فشنس NTL/PZLR4* در جهت بررسی کنترل بیوفیلیم تولید شده توسط سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* در عفونت‌های ناشی از ایمپلنت دندان انجام گرفت. هم‌چنین هدف گذاری در

تشخیص مولکولی استافیلوکوکوس اورئوس

جهت تعیین هویت مولکولی جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس تمامی ایزوله‌ها از نظر حضور ژن NUC با استفاده از

آزمون PCR بررسی شدند. سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 25923 به عنوان کنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفت (۱۲) (جدول ۱ و ۲).

جدول ۱. ترادف پرایمر ژن NUC

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

جدول ۲. شرایط دمایی و زمانی سیکل PCR ژن NUC

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

مواد گیاهی و عصاره‌گیری آن‌ها

گونه‌های گیاهی تمشک (*Rubus ulmifolius*)، ترخون (*Centaurea*)، گل گندم (*Artemisia dracunculus*)، خاکشیر (*Descurainia sophia*) و ریحان (*Ocimum basilicum*) از باغات اطراف استان فارس جمع‌آوری گردید. شایان ذکر است گیاهان نامبرده توسط آقای دکتر امیر برجیان، دارای دکتری تخصصی سیستماتیک گیاهی گروه باغبانی از دانشگاه آزاد واحد جهرم، مورد شناسایی قرار گرفت. به منظور تهیه عصاره گیاهی، در ابتدا نمونه‌ها در دمای اتاق به مدت ۷ روز دور از نور آفتاب و باد خشکانیده و سپس آسیاب شدند. یکصد گرم از هر کدام از نمونه‌های گیاهی در مجموع با ۶۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درصد مخلوط و به مدت ۱۰ ساعت با دستگاه سوکسله عصاره‌گیری و ترکیبات ریز ناخواسته از عصاره‌های گیاهی با کاغذ صافی فیلتر شد. سپس تمامی ترکیبات و هم‌چنین حلال آلی استفاده شده، با دستگاه روتاری (*Heidolph*, آلمان) در دمای کمتر از ۴۰ درجه سانتی‌گراد از عصاره‌ها حذف شدند. عصاره‌های غلیظ به‌دست آمده با غلظت معینی از *DMSO* (*Dimethyl Sulfoxide*) رقیق و از پالایه میلی پور ۰/۲۲ میکرونی عبور داده شد و در نهایت عصاره‌های به‌دست آمده در ویال‌های استریل و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (۱۳).

آزمون حساسیت ضد میکروبی

در راستای بررسی میزان فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های گیاهی تمشک، ترخون، گل گندم، خاکشیر و ریحان، در ابتدا ۱۰۰

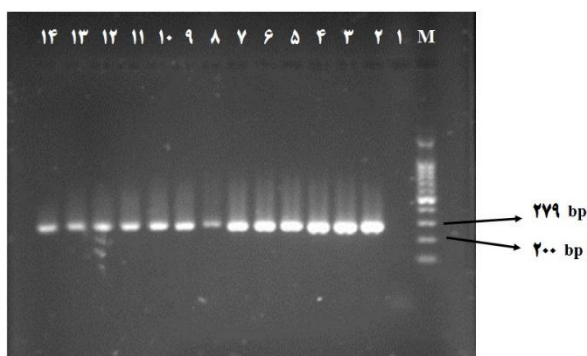
میکرولیتر از کشت ۲۴ ساعته باکتری *اگروباکتریوم تومی فشنس* ( $OD_{600}=0.1$ ) در محیط کشت *Mueller-Hinton* (MH) پخش گردید. از هر کدام از عصاره‌ها ۲۰ میکرولیتر به دیسک‌های استریل ۶ میلی‌متری آغشته شدند. دیسک‌های تتراسایکلین به عنوان آنتی‌بیوتیک‌های استاندارد به همراه دیسک‌های آغشته به عصاره‌های گیاهی در پلیت‌ها قرار داده شده و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری گردید. فعالیت ضد میکروبی عصاره‌ها با اندازه‌گیری قطر هاله بازدارندگی ارزیابی شد (۱۳).

آزمون ضد حساسیت جمعیتی

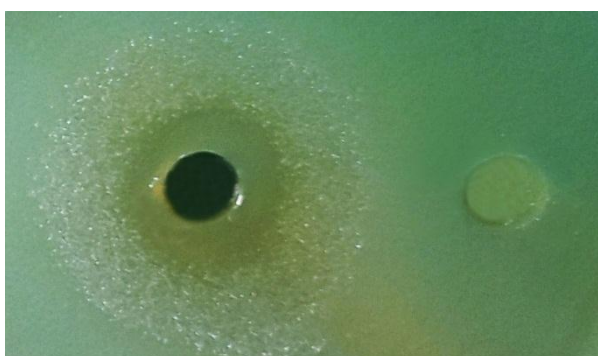
۵ میلی‌گرم از محیط کشت *STA* (۱/۳ گرم آگار، ۲ گرم تریپتوفان، ۱ گرم سدیم کلراید، ۲۰۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه) با ۱۰۰ میکرولیتر از کشت ۲۴ ساعته سویه *اگروباکتریوم تومی فشنس* *NTL/PZLR4*، ۵۰ میکرولیتر *X-Gal* و ۲۰ میکرولیتر از ۱۰۰ میکروگرم در لیتر *C12-HSL* به عنوان منبع *AHL* خارجی تهیه شد. مواد فوق به آرامی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



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



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



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

با ایجاد هاله روشن در اطراف چاهک‌ها در برابر یک پس زمینه آبی رنگ از باکتری *NTL/PZLR4* فعال ایجاد می‌شود (۱۱). توانایی تشکیل بیوفیلم به روش میکروتیتر پلیت (MTP) به منظور بررسی خصوصیات فنوتیپیک تشکیل بیوفیلم از روش MTP (Microtiter Plate Assay) استفاده گردید. در این روش محیط کشت Trypticase Soy Broth درون چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای ریخته شد و سپس سوسپانسیون باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* معادل نیم مک فارلند به هر چاهک اضافه شد. پس از گرمخانه‌گذاری برای حذف باکتری‌های متصل نشده به دیواره چاهک‌ها، از بافر (Phosphate Buffer Solution) استفاده شد و پس از تثبیت باکتری‌های متصل شده با متانول، رنگ آمیزی پلیت الیزا با سافرانین انجام گرفت و در نهایت در طول موج ۴۹۰ نانومتر با استفاده از دستگاه قرائت کننده الیزا (ELISA Reader)، حداکثر طول موج جذبی (OD) هر چاهک خوانده شد. توانایی تشکیل بیوفیلم توسط جدایه‌های مورد بررسی بر اساس میزان جذب سافرانین متصل شده به سلول‌های موجود در بیوفیلم، طبقه‌بندی گردیده و با استفاده از روش محاسبه cut-off، نتایج به دست آمده مورد بررسی قرار گرفت (۱۳). سپس با هدف تاثیر عصاره شکوفه تمشک در اتصال سویه‌ها به دیواره چاهک و ایجاد بیوفیلم، غلظت‌های ۱۰، ۳۰ و ۵۰ میکرولیتر عصاره گیاهی رقیق شده با DMSO به محیط کشت تریپتیک سوی براث اضافه شده و مراحل فوق انجام پذیرفته و نتایج بدست آمده با مرحله ی قبل مقایسه و مورد بررسی قرار گرفت.

#### تحلیل آماری

نتایج یافته‌ها با استفاده از نسخه بیست و یکم نرم افزار SPSS و آزمون مربع کای، تست دقیق فیشر و آزمون کروسکال-والیس مورد بررسی قرار گرفت. سطح معنی‌داری برابر با  $p < 0.05$  در نظر گرفته شد.

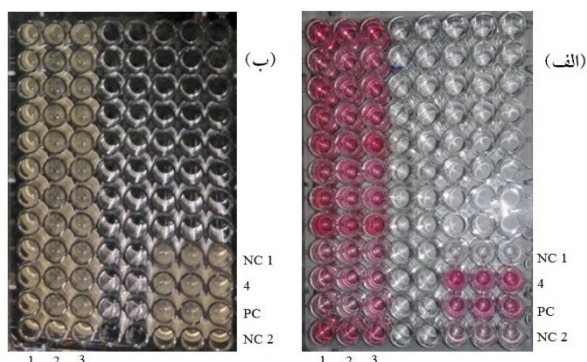
#### ۴. یافته‌ها

تشخیص و شناسایی جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* پس از آزمون‌های بیوشیمیایی استاندارد به روش مولکولی و از طریق

**جدول ۳.** میزان خاصیت ضد حساسیت جمعیتی (انحراف معیار  $\pm$  میلی متر).

گونه گیاهی	محل نمونه گیری	خاصیت ضد میکروبی	خاصیت ضد حذصاب حسگری
خاکشیر	برگ و گل	$(7/5 \pm 0/3)$	-
ترخون	برگ	$(6/5 \pm 0/4)$	-
گل گندم	گل	$(8/2 \pm 0/6)$	-
تمشک	شکوفه	$(7/4 \pm 0/5)$	$(21 \pm 0/5)$
ریحان	برگ	$(7/8 \pm 0/3)$	-
DMSO	-	-	-
تتراسایکلین	-	$(34 \pm 0/4)$	-

تمامی جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس در عدم حضور عصاره گیاهی دارای قدرت تولید بیوفیلم بودند (جدول ۵).



**شکل ۴.** ارزیابی تشکیل بیوفیلم به روش میکروتیتر پلیت با ۳ تکرار. (۱-۴): ۱۳ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس؛ NC 1: محیط کشت تریپتیک سوی برات (کنترل منفی)؛ NC 2: استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس (کنترل منفی)؛ PC: استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 33591 (کنترل مثبت). الف) جذب سافرانین توسط سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس در عدم حضور عصاره شکوفه تمشک. ب) عدم جذب سافرانین در حضور عصاره گیاهی در چاهک‌ها.

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

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

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

\*ODc کنترل، برابر با  $0/083$  می‌باشد که سایر چاهک‌ها با آن مقایسه شد.

**جدول ۵.** توانایی تشکیل بیوفیلم جدایه‌ها در عدم حضور و حضور عصاره شکوفه تمشک ( $p < 0/05$ ) به روش MTP

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

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

## ۵. بحث

در این مطالعه اثر عصاره شکوفه تمشک بر خاصیت‌های حساسیت جمعیتی و قدرت تولید بیوفیلیم در جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* از عفونت ایمپلنت دندان‌های مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاکی از بازدارندگی QS با ممانعت از هیدرولیز X-gal در سویه گزارشگر آگروباکتریوم تومی فشنس NTL/PZLR4 به واسطه‌ی عصاره شوفه تمشک می‌باشد. همچنین عصاره شکوفه تمشک مانع از اتصال و تضعیف اتصال جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* در جهت تولید بیوفیلیم به دیواره چاهک‌های پلیت الیزا شد که این بدان معناست که عصاره شکوفه تمشک دارای خاصیت ضد بیوفیلیم نیز می‌باشد. ارتباط سلول به سلول یکی از مهم‌ترین رفتارهای بیولوژیکی باکتری‌ها بوده که بیان ژن را در آلودگی باکتریایی تنظیم می‌نماید. در واقع باکتری‌ها از سیگنال‌های مولکولی جهت ایجاد ارتباط و پاسخ مناسب به رفتارهای اجتماعی هدفمند نسبت به تحریکات محیطی استفاده می‌نمایند. این پدیده که تحت عنوان Quorum Sensing نام دارد، یکی از روش‌های مطمئن در بررسی اثر مواد طبیعی و غیرشیمیایی علیه باکتری‌های بیماری‌زا و همچنین رفع مشکلاتی که در اثر ایجاد مقاومت در باکتری‌ها به دلیل کاربرد بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها پدید می‌آیند می‌باشد. با توجه به این که بسیاری از عوامل حیاتی باکتری‌ها از جمله تولید فاکتورهای بیماری‌زایی و یا عوامل وابسته به بیماری‌زایی تحت سیطره کوئوروم سنسینگ می‌باشد، بنابراین یافتن هرگونه ترکیبات طبیعی که در چیره شدن این پدیده نقش داشته باشد می‌تواند به عنوان روشی نوین در مقابله با عوامل بیماری‌زا و کاهش آلودگی‌ها مطرح باشد (۳). تحقیقاتی وجود دارد که نشان می‌دهد بعضی از گیاهان ترکیباتی را تولید

می‌نمایند که قادر هستند سیگنال‌های مولکولی باکتریایی را تحت تاثیر قرار داده و باعث بازدارندگی رفتارهایی شوند که تحت کنترل پدیده QS هستند. پژوهش حاضر با هدف بررسی پتانسیل بازدارندگی ویژگی حدنصاب حسگری ۵ عصاره گیاهی شکوفه تمشک (*Rubus ulmifolius*)، ترخون (*Artemisia dracunculus*)، گل‌گندم (*Centaurea cyanus*)، خاکشیر (*Descurainia sophia*) و ریحان (*Ocimum basilicum*) با کمک مدل آزمایشگاهی آگروباکتریوم تومی فشنس NTL/PZLR4 انجام گرفت. باکتری مذکور جهت شناسایی مهار سیگنال خارجی AHL با ۱۲ زنجیره کربنی (C12) محیط به کار گرفته شد. در این سویه با توجه به این که ژن *lacZ* با پروموتور وابسته به QS ترکیب شده است، فعال شدن این پروموتور به واسطه حضور سیگنال خارجی AHL منجر به بیان پیوسته بتاگالاکتوزیداز (که با شکستن گروه مولکولی رنگی (chromophore) از X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indoyl-β-D-galactopyranoside (X-gal) تولید رنگ آبی می‌نماید) می‌شود. ترکیبات ضد QS باعث ممانعت از پروموتور وابسته به QS و نهایت بیان ژن *lacZ* می‌شود، از این رو از هیدرولیز X-gal و ظهور رنگ آبی جلوگیری به عمل می‌آید (۱۲). در این تحقیق، باکتری آگروباکتریوم تومی فشنس NTL/PZLR4 به عنوان استرین گزارشگر دریافت مولکول‌های اسیل هموسرین لاکتون (AHL) استفاده گردید و عدم تشکیل رنگ آبی در این استرین با حضور سیگنال خارجی نشان‌دهنده بازدارندگی QS توسط عصاره گیاهی شکوفه تمشک می‌باشد. سیستم QS یک باکتری بیماری‌زا را به روش‌های مختلفی می‌توان مختل کرد که تجزیه آنزیمی مولکول‌های پیام‌رسان، رایج‌ترین این شیوه‌هاست. اما اختلال در تولید AHL از طریق



عفونت بیوفیلیم مربوط به *استافیلوکوکوس اورئوس* به حساب می‌آید (۱۶). هم‌چنین، در تحقیقی دیگر، کوآو و همکاران در سال ۲۰۰۸ نشان دادند که گیاهان دارویی *Lonicera Ballota Juglans regia Castanea sativa alpigena, Leopoldia comosa Rosmarinus officinalis nigra Rubus Rosa canina Cyclamen hederifolium ulmifolius* و *Malva sylvestris* دارای خاصیت باکتریواستاتیک بر سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین می‌باشند (۱۷). در این پژوهش از روش MTP جهت تشخیص میزان قدرت تشکیل بیوفیلیم توسط جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* استفاده شد. پس از بررسی میزان OD هر کدام از چاهک‌ها، ۱۱ جدایه (۸۴/۶۱ درصد) تولیدکننده بیوفیلیم قوی و ۲ جدایه (۱۵/۳۸ درصد) تولیدکننده بیوفیلیم متوسط گزارش شدند. سپس، در این روش، بار دیگر عصاره شکوفه تمشک در غلظت‌های مختلف ۱۰، ۳۰ و ۵۰ میکرولیتر به چاهک‌ها اضافه گردید. نتایج حاصل نشان داد که هیچ کدام از جدایه‌ها در غلظت ۵۰ میکرولیتر عصاره شکوفه تمشک، قادر به تشکیل بیوفیلیم نبودند. عصاره شکوفه تمشک با میانگین میزان جذب نوری کمتر از  $OD \leq 0.08324$  باعث عدم اتصال و در نهایت عدم تولید بیوفیلیم در همه‌ی جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* شد. شایان ذکر است که مولکول‌های مهارکننده سیگنال حساسیت جمعیتی در شکوفه تمشک، هنوز مشخص نیست و می‌بایست تحقیقات بیشتری در این خصوص انجام پذیرد.

#### ۶. نتیجه‌گیری

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

LuxI و اختلال در اتصال آن به پروتئین گیرنده LuxR نیز از جمله روش‌های دیگر خاموش کردن QS است. در این تحقیق عصاره شکوفه تمشک واجد توانایی اختلال در عملکرد LuxI و LuxR یافت شد که نتیجه بسیار ارزشمندی است و حاکی از وجود آنتاگونیست‌هایی با توانایی‌های چندجانبه برای مختل کردن QS است. نتایج به‌دست‌آمده از مطالعه براکمن و همکاران در سال ۲۰۱۵ نشان داد که بیوفیلیم‌ها با ۸۰ درصد از عفونت‌های میکروبی در ارتباط هستند. هم‌چنین دریافتند که رشد میکروارگانیسم‌ها در بیوفیلیم‌ها می‌تواند مقاومتشان را به عوامل ضد میکروبی افزایش دهد و با مهار فرآیند کوئوروم سنسینگ می‌توان مکانیسم تولید بیوفیلیم را تحت تاثیر قرار داد (۸). در این پژوهش از عصاره شکوفه تمشک به عنوان مهارکننده QS استفاده و مشخص شد که ترکیبات این عصاره گیاهی با مهار QS، باعث جلوگیری از تشکیل بیوفیلیم شد. نتایج حاصل از مطالعه مخفیان و همکاران در سال ۲۰۱۵ مشخص نمود که دو عصاره گیاهی از مک و شوید به‌صورت معنی‌داری دارای خاصیت ضد حساسیت جمعیتی می‌باشند. به‌طوری‌که میزان این ویژگی در گیاه از مک کمتر ( $0.3 \pm 12/25$  میلی‌متر) از گیاه شوید ( $0.5 \pm 13/3$  میلی‌متر) بود. هم‌چنین هر دو گیاه دارای خاصیت باکتری‌کشی نیز بودند، به‌طوری‌که میزان آن در گیاه از مک ( $0.2 \pm 9/58$  میلی‌متر) بیش از گیاه شوید ( $0.2 \pm 7/4$  میلی‌متر) گزارش گردید (۳). ارزیابی میرزایی و همکاران در سال ۲۰۱۴ نشان داد که ۴۶ درصد از جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین از نظر تشکیل بیوفیلیم قوی بودند. همه ایزوله‌ها دارای ژن‌های *icaC* و *icaD* بودند. در حالی که شیوع ژن‌های *icaA* و *icaB* به ترتیب ۶۰/۳ و ۵۱ درصد گزارش شد (۱۵). بر اساس تحقیقات کوآوو و همکاران در سال ۲۰۱۲، عصاره 220D-F2 از ریشه تمشک (*Rubus ulmifolius*) می‌تواند در جلوگیری از تشکیل بیوفیلیم *استافیلوکوکوس اورئوس* تا حدی که بتوان حساسیت آنتی‌بیوتیکی بدون اثرات سمی در سلول‌های معمولی را افزایش داد دخیل باشد. از این رو، 220D-F2 یک کاندید قوی برای توسعه به عنوان یک داروی گیاهی برای استفاده در پیشگیری و درمان

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

#### ۷. تقدیر و تشکر

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

#### ۸. سهم نویسندگان

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

#### ۹. تضاد منافع

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

**References**

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