Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 13:33 +0330 on Saturday October 16th 2021

مقاله پژوهشی

تأثیر بازدارندگی عصاره‌های گیاهی استویا و گل سرخ بر مکانیسم باکتریایی Quorum Sensing

میلاد مخفیان [۱]، الهام پیشگر [۲*]

تاریخ دریافت ۱۳۹۸/۰۱/۱۸ تاریخ پذیرش ۱۳۹۸/۰۵/۰۱

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: کوئوروم سنسینگ مکانیسمی است که در تنظیم بیان بسیاری از ژن‌های حیاتی در باکتری‌ها دخالت دارد. هرگونه اختلال در سیستم مذکور منجر به مهار عفونت‌های باکتریایی خواهد شد. این مطالعه با هدف ارزیابی پتانسیل ضد حساسیت جمعیتی عصاره‌های گیاهی گل سرخ و استویا در مهار عفونت ایجادشده توسط سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* انجام گردید.

مواد و روش کار: ۱۰ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* از عفونت ایمپلنت دندانی جداسازی و شناسایی شدند. گونه‌های گیاهی از باغات استان فارس جمع‌آوری و عصاره گیری شدند. تأثیر عصاره گیاهان بر مکانیسم حساسیت جمعیتی با کمک سویه گزارشگر *کروموباکتریوم ویولاسئوم CV026* و همچنین قدرت تولید بیوفیلم جدایه‌ها به روش میکروتیترپلیت ارزیابی گردید. ترکیبات موجود در عصاره‌های گیاهی گل سرخ و استویا توسط GC-MASS شناسایی گردید.

یافته‌ها: عصاره‌های گیاهی هردو بطور معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) دارای خاصیت ضد حساسیت جمعیتی بوده به‌طوری‌که این خاصیت در گل سرخ (۱۹ ±۰/۵)نسبت به استویا(۱۷ ±۰/۵) بیشتر می‌باشد. هر دو عصاره دارای خاصیت ضد میکروبی و ضد بیوفیلم نیز بودند. نتایج GC-MASS مشخص نمود که گل سرخ دارای ترکیباتی همچون Geraniol، β-Citronellol و Linalool و استویا دارای Furfural، Terpinen-4-ol، Linalool و α-Pinenem می‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری: با توجه به ویژگی ضد حساسیت جمعیتی عصاره‌های گل سرخ و استویا، می‌توان با شناسایی و ارزیابی دقیق‌تر ترکیبات مؤثر این عصاره‌ها در راستای پیشگیری و درمان عفونت‌هایی با منشاء باکتریایی استفاده نمود.

کلیدواژه‌ها: QS، AHL، ضد حساسیت جمعیتی، *کروموباکتریوم ویولاسئوم*

مجله پزشکی ارومیه، دوره سی‌ام، شماره ششم، ص ۴۵۳-۴۴۳، شهریور ۱۳۹۸

آدرس مکاتبه: فارس، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم، گروه میکروبیولوژی، تلفن: ۹۸۹۱۶۴۸۷۷۰۴۰

Email: Elhampishgar1504@gmail.com

مقدمه

به فرآیند ارتباط بین سلولی در باکتری‌ها و برهم‌کنش آن‌ها به‌واسطه‌ی تبادل اطلاعات با سلول‌های پیرامون خود بر اساس تراکم سلولی، حساسیت جمعیتی یا Quorum Sensing (QS) گفته می‌شود. به‌عبارت‌دیگر کوئوروم سنسینگ به درک، دریافت و پاسخ به سیگنال‌های تولیدشده به‌واسطه‌ی سایر باکتری‌ها گفته می‌شود که با به حدنصاب رسیدن غلظت سیگنال ناشی از ازدیاد سلول‌های باکتریایی در محیط اطراف فراهم می‌گردد (۱). تبادل اطلاعات در فرآیند حساسیت جمعیتی از طریق مولکول‌های خارج سلولی تولیدشده توسط خود سلول بنام خودالقاگرها (autoinducers) انجام‌شده که باعث تنظیم بیان بسیاری از ژن‌ها ازجمله تولید فاکتورهای بیماری‌زایی (virulence)، تشکیل بیوفیلم، تولید آنتی‌بیوتیک، اسپورولاسیون، بیولومینسانس و غیره می‌گردد (۲). QS دارای چند سیستم مجزا ازجمله LuxI/R می‌باشد که در اکثر باکتری‌های گرم منفی مورداستفاده قرار می‌گیرد. سیگنال‌های بکار رفته در این نوع سیستم، ان-آسیل هموسرین لاکتون (N-AHL) نامیده می‌شود. نوع دیگر این سیستم، از نوع پپتیدی می‌باشد که توسط باکتری‌های گرم مثبت استفاده می‌گردد (۳). به دلیل شباهت فرآیند کوئوروم سنسینگ در باکتری‌های گرم مثبت به تنظیم بیان ژن در سیستم‌های دوجزئی، به آن‌ها کوئوروم سنسینگ دوجزئی نیز گفته می‌شود که مولکول‌های سیگنالی الیگوپپتیدی مرتبط در این نوع سیستم Autoinducing Peptids (AIP) نامیده می‌شود (۲). با توجه به اینکه که *استافیلوکوکوس اورئوس* یک باکتری گرم مثبت است، غشای آن‌ها نسبت به پپتیدها نفوذناپذیر بوده و نیازمند به

[۱] گروه میکروبیولوژی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران (نویسنده مسئول)

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

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 13:33 +0330 on Saturday October 16th 2021

رسپتورهایی برای انتقال AIPs به داخل سیتوپلاسم می‌باشد. در این راستا گیرنده‌های هیستیدین کینازی (HK)، ترانسپورتر AIP و پروتئین تنظیم‌کننده پاسخ سلولی (RR) بر روی یک اپرون قرار دارند که بیان این اپرون باعث فسفریله شدن، تولید سیگنال و پاسخ به فرآیند کوئوروم سنسینگ می‌گردد (۴). خطرات ناشی از استفاده بی‌رویه و بروز مقاومت باکتری‌ها در برابر عوامل ضد میکروبی در ساختار بیوفیلم و منجر به شکست شدن روش‌های درمانی مبتنی بر آنتی‌بیوتیک، محققان را وادار نموده تا به دنبال روش‌های نوین درمانی متکی بر ترکیبات غیرسنتتیکی همچون ترکیبات گیاهی باشند. یکی از موضوعات جدیدی که طی چند سال اخیر نظر دانشمندان را به خود جلب نموده است بهره‌مندی از ترکیبات طبیعی موجود در گیاهان جهت ایجاد اختلال در فرآیند کوئوروم سنسینگ و درنتیجه مهار آلودگی‌های باکتریایی وابسته QS می‌باشد (۵). هرگونه مکانیسم تداخل در ارتباطات بین سلولی باکتری‌ها Quorum Quenching (QQ) نامیده می‌شود، بدین معنی که با مهار کوئوروم سنسینگ می‌توان به دنبال اهداف درمانی مناسب با روش‌های مهارکننده‌های طبیعی مناسب در بیماری‌های باکتریایی بود. با توجه به اثرات جانبی داروهای شیمیایی، جایگزین کردن گیاهان بزرگ‌ترین منبع دارویی در طبیعت با ترکیبات مؤثر ضد میکروبی و ضد حساسیت جمعیتی، یکی از بهترین گزینه‌ها در این روش درمانی محسوب می‌شود (۶). طی تحقیقات به‌عمل‌آمده توسط محققان، مشخص شده است که گیاهانی همچون وانیل (۷)، سیر (۸)، زردچوبه (۹)، شوید (۱)، زنجبیل (۱۰)، زیره (۱۱) و غیره حاوی ترکیبات مؤثری با خاصیت ضد حدنصاب حسگری می‌باشند. مشخص شده است که ترکیباتی ترپنی موجود در گیاهان مانند سینامالدئید، یوژنول و ۴۹-سیترونلول دارای خاصیت بازدارندگی حساسیت جمعیتی در مدل آزمایشگاهی سویه *کروموباکتریوم ولاسئوم ۴۶* شده است. همچنین کارواکرول‌ها تأثیر بسزایی در مهار بیوفیلم تولیدشده توسط *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سالمونلا تایفی موریوم* داشته است (۶). این پژوهش با هدف ارزیابی بازدارندگی خاصیت حساسیت جمعیتی عصاره‌های گل سرخ و استویا بر سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* انجام گرفت.

مواد و روش کار

سویه‌های باکتریایی و محیط‌های کشت:

در این پژوهش از دو سویه باکتریایی *استافیلوکوکوس اورئوس* و *کروموباکتریوم ویولاسئوم CV026* (تهیه شده از دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران) به‌عنوان سویه گزارشگر (biosensor) گیرنده مولکول‌های اسیل هموسرین لاکتون (AHL) استفاده گردید. نمونه‌برداری از قسمت‌های اباتمنت و کاور اسکرو ایمپلنت دندانی بیماران مراجعه‌کننده به دانشکده دندان‌پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شیراز در محیط کشت تیوگلیکولات (Thioglycollate broth) انجام و جهت تشخیص به آزمایشگاه انتقال یافت. جهت تشخیص جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، تست‌های بیوشیمیایی و مولکولی ازجمله ژن *COA* انجام گردید(۱۲). از محیط کشت LB (Luria Bertani) برای کشت سویه *کروموباکتریوم ویولاسئوم CV026* و از محیط کشت Soft STA (Top Agar) مربوط به شرکت مرک آلمان (Merck) به‌منظور انجام آزمون ضدحساسیت جمعیتی استفاده گردید. همچنین در این مطالعه از مولکول سیگنالی C12-HSL: N-(3-Oxooctanyl)-L-homoserine lactone (C12H19NO4, Molecular Weight 241.28) خریداری شده از شرکت سیگما استفاده شد. این مطالعه با کد 1959-1-16-01 و 73/118248 به تأیید کمیته اخلاق معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحدهای جهرم و علوم تحقیقات به ثبت رسیده است.

تشخیص مولکولی جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*:

پس از جداسازی ده جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* با تست‌های تشخیصی رنگ آمیزی، کوآگولاز، DNase و مانتیول، تعیین هویت مولکولی تمامی ایزوله‌ها از نظر حضور ژن *COA* با استفاده از آزمون PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. سویه استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 25923 به‌عنوان کنترل مثبت در این آزمون در نظر گرفته شد (۱۳) (جدول ۱ و ۲).

مواد گیاهی و عصاره گیری آن‌ها:

گونه‌های گیاهی گل سرخ (*Rosa damascena*) و استویا (*Stevia rebaudiana*) از دشت‌های اطراف استان فارس جمع‌آوری و توسط دکتر حکیمه دژکام، دکتری تخصصی گیاهان دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم شناسایی گردید. سرشاخه‌های گلدار نمونه‌های جمع‌آوری شده، دور از نور خورشید در دمای اتاق خشک و سپس آسیاب شدند. میزان پنجاه گرم از نمونه‌ی آسیاب شده‌ی گیاهی، با ۴۰۰ میلی لیتر اتانول ۹۶ درصد مخلوط و به مدت ۷ ساعت با دستگاه استخراج سوکسله (Soxhlet extractor) عصاره گیری شد. به‌منظور حذف حلال آلی استفاده شده در عصاره‌ها، با دستگاه روتاری (Heidolph، آلمان) در دمای کم‌تر از $40^{\circ}C$ انجام شد. برای رقیق کردن عصاره‌ها از (Dimethyl Sulfoxide DMSO) و جهت استریل کردن از پالایه میلی پور ۰/۲۲ میکرونی استفاده شد. سپس عصاره‌ها در دمای $-20^{\circ}C$ نگهداری شدند (۱).

تعیین الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی:

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 13:33 +0330 on Saturday October 16th 2021

جهت بررسی میزان فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌های گیاهی گل سرخ و استویا، ۳۰ میکرولیتر (غلظت ۲۵ درصد) از هر یک از عصاره‌ها به دیسک‌های بلانک استریل اضافه شد، سپس ۱۰۰ میکرولیتر از کشت ۲۴ ساعته سوسپانسیون‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *کروموباکتریوم ویولاسئوم CV026* با کدورتی معادل غلظت ۰/۵ مک فارلند ($۱٫۵ \times ۱۰^{۸}$) با سوآپ استریل روی محیط Mueller-Hinton Agar (MH) بصورت کشت چمنی تلقیح کرده و پس از چند دقیقه دیسک‌های آنتی‌بیوتیک و عصاره با فاصله ۲۲ میلیمتر از یکدیگر و ۱۶ میلیمتر از جداره پلیت روی محیط قرار داده شدند. دیسک حاوی حلال DMSO به‌عنوان کنترل منفی به پتری‌ها اضافه گردید. همچنین برای تعیین میزان حساسیت دارویی جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و سویه *کروموباکتریوم ویولاسئوم* از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی استاندارد استفاده گردید. پلیت ها در دمای $۳۷^{\circ}C$ برای *اورئوس* و $۳۰^{\circ}C$ برای *CV026* به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شد. سپس فعالیت ضدمیکروبی دارویی و عصاره‌ها با اندازه‌گیری قطر هاله‌ی عدم رشد طبق دستورالعمل CLSI انجام شد (جدول ۲) (۱).

توانایی تشکیل بیوفیلم:

به‌منظور سنجش میزان توانایی تشکیل در جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* از روش میکروتیتر پلیت (Microtiter Plate **Assay**)MTP استفاده شد. مقدار ۱۸۰ میکرولیتر محیط (Trypticase Soy Broth) TSB حاوی یک درصد گلوکز درون چاهک‌های پلیت الیزا ریخته شد و سپس ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* معادل استاندارد نیم مک فارلند به هر چاهک اضافه شد (به‌منظور کاهش خطا، هر کدام از جدایه‌ها در سه تکرار و در سه چاهک در نظر گرفته شد). پس از ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری جهت حذف باکتری‌های متصل نشده، با محلول بافر PBS (Phosphate Buffer Solution) شستشو و برای تثبیت باکتری‌های متصل شده از ۱۲۰ میکرولیتر متانول استفاده شد و با سافرانین ۱٪ پلیت الیزا رنگ آمیزی شد. سپس با استفاده از دستگاه قرائت کننده الیزا (ELISA Reader) مدل StatFax3200 شرکت وستا تجهیز پارت ایران، در طول موج ۴۸۰ نانومتر، میزان غلظت هر چاهک خوانده شد. توانایی تولید بیوفیلم در جدایه‌ها بر اساس میزان اتصال سافرانین به سلول‌های موجود در بیوفیلم، بررسی و با استفاده از روش cut-off، نتایج به‌دست آمده محاسبه گردید (۱۴). سپس با هدف بررسی اثر عصاره‌های گل سرخ و استویا بر ایجاد بیوفیلم، میزان ۱۰، ۳۰ و ۵۰ میکرولیتر (غلظت ۲۵ درصد) عصاره گیاهی به هر چاهک در سه تکرار اضافه و شبیه مراحل بالا انجام شد. نتایج به‌دست آمده با مرحله‌ی قبل مقایسه و مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۳).

آزمون ضد حساسیت جمعیتی:

پنجاه میلی لیتر از محیط کشت STA (۲ گرم تریپتوفان، ۳ /۱ گرم آگار، ۱ گرم سدیم کلراید، ۲۰۰ میلی لیتر آب دیونیزه) با ۲۰۰ میکرولیتر از کشت ۲۴ ساعته سویه *کروموباکتریوم ویولاسئوم CV026* با غلظتی همسان با غلظت نیم مک فارلند ($۱٫۵ \times ۱۰^{۸}$) و ۱۰۰ میکرولیتر سگینال خارجی C12-HSL تهیه شد. پس از ترکیب کردن مواد، آن را بر روی محیط پایه LB agar که از قبل در همان پلیت آماده شده ریخته و بعد از سرد شدن، چاهک‌هایی به قطر ۵ میلی متر ایجاد کرده و درون آن‌ها با ۲۰ تا ۳۰ میکرولیتر از عصاره‌های تهیه شده پر می‌شود. در این آزمون حلال DMSO به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. پلیت ها در دمای $۳۰^{\circ}C$ به مدت ۲ روز گرمخانه گذاری شد. مهار کوئروم سنسینگ از سنتز ویولاسین با ایجاد هاله کرمی رنگ حاوی سلول‌های زنده سویه *CV026* در اطراف چاهک قابل مشاهده می‌باشد. این در حالیست که زمینه‌ی اطراف هاله‌های کرمی رنگ، بنفش رنگ می‌باشد که این امر گویای فعالیت و تولید ویولاسین توسط سویه *CV026* در محیط کشت می‌باشد. (۱۵).

آنالیز GC-MASS:

جهت شناسایی ترکیبات موجود در عصاره‌های گیاهی گل سرخ و استویا از دستگاه کروماتوگرافی گازی Agilent 7890A ساخت آمریکا، مجهز به آشکارساز جرمی مدل Agilent 5975 C و نرم‌افزار HP Chemstation در محیط ویندوز و اینجکتور با مد split/splitless و ستون مویین HP-5 MS با طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۰/۲۵ میلی متر و ضخامت ۰/۲۵ میکرومتر از کمپانی Agilent آمریکا مورد استفاده قرار گرفت. دمای اولیه آون به مدت سه دقیقه در ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگه داشته شده و سپس با سرعت ۸ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه تا ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد افزایش داده و ۳ دقیقه در دمای مذکور ماند. همچنین از گاز هلیوم به‌عنوان گاز حامل استفاده گردید. دریچه تزریق در مد Split با نسبت ۵۰۰: ۱ و گستره رنج جرمی از ۴۰ تا ۵۰۰ جرم بر بار تنظیم گردید. بمنظور شناسایی ترکیبات از کتابخانه جرمی Wily 2007 و NIST 2005 استفاده شد. پردازش داده‌های دستگاه با استفاده از نرم‌افزار Chemstation در محیط ویندوز انجام شد.

آنالیز آماری:

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 13:33 +0330 on Saturday October 16th 2021

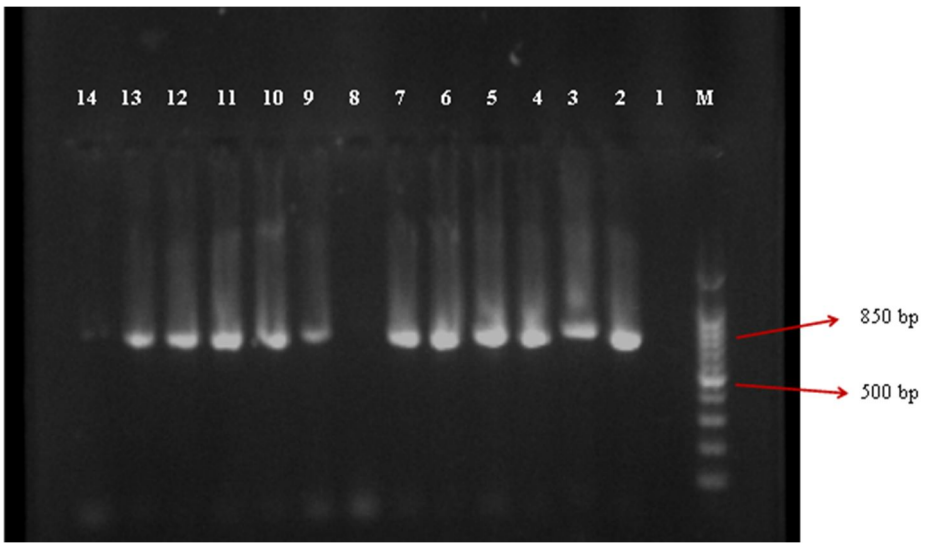
تجزیه‌وتحلیل نتایج به‌دست آمده با استفاده از نسخه بیست و یکم نرم‌افزار SPSS، آزمون مربع کای و آزمون کروسکال-والیس، در سطح اطمینان ۹۵ درصد (p<۰/۰۵) مورد بررسی قرار گرفت. این مطالعه با کد ۱۹۵۹۰۱-۱-۱۶- و 73/118248 به تأیید کمیته اخلاق معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحدهای جهرم و علوم تحقیقات به ثبت رسیده است.

یافته‌ها

پس از تشخیص جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* با تست‌های بیوشیمیایی استاندارد، شناسایی به روش مولکولی از طریق تکثیر ژن اختصاصی کوآگولاز (*COA*) با توالی پرایمر رفت: 5´-ATAGAGATGCTGGTACAGG-3´ و توالی برگشت: 5´-GCTTCCGATTGTTCGATGC-3´ (850bp) به روش PCR انجام شد(۱۲) (جدول ۱). جدایه‌های واجد قطعه *COA*، مثبت گزارش شدند (شکل ۱). خاصیت ضد میکروبی عصاره‌ها و آنتی‌بیوتیک ها بر سویه *کروموباکتریوم ویولاسئوم CV026* و جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس به روش انتشار دیسک انجام و نتایج آن مطابق جدول ۲ ثبت گردید (جدول و شکل ۲). همچنین اثر ضد بیوفیلمی عصاره‌ها با عدم اتصال سلول‌های باکتریایی به دیواره چاهک مشاهده و بررسی گردید (جدول ۳ و ۴). حساسیت جمعیتی دو گیاه گل سرخ (۰/۵± ۱۹ میلی متر) و استویا (۰/۵± ۱۷ میلی متر) نیز با پدیدار شدن هاله کرمی رنگ در اطراف چاهک‌ها در پس زمینه بنفش رنگ سویه *کروموباکتریوم ویولاسئوم CV026* مشخص گردید (شکل ۲). حلقه درونی نشان‌دهنده خاصیت ضدمیکروبی بوده و فاقد هرگونه سلول زنده می‌باشد درحالی‌که در حلقه دوم سلول‌های باکتریایی رشد نموده ولی ویولاسئین تولید نکرده و نشان‌دهنده خاصیت ضد حدنصاب حسگری می‌باشد. هر کدام از عصاره‌های گیاهی استویا و گل سرخ به‌ترتیب ۰/۵± ۷/۴ و ۰/۳± ۸/۸ میلی متر خاصیت ضدمیکروبی از خود نشان دادند (p<۰/۰۵). در این مطالعه DMSO به‌عنوان کنترل منفی هیچ خاصیت ضد میکروبی یا ضد حساسیت جمعیتی از خود نشان نداد.

جدول (۱): شرایط دمایی و زمانی سیکل PCR ژن *COA*

Genes	Initial Denaturation	Annealing	Extension	Denaturation	Final Extension
COA	94 °C for 1 min	94 °C for 1 min	55 °C for 1 min	72 °C for 1 min	72 °C for 1 min
Cycles	1 Cycle	30 Cycles	30 Cycles	30 Cycles	1 Cycle



شکل (۱): محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در ژل آگارز ۱/۵ درصد. ردیف M: مارکر bp ۱۰۰، ردیف ۱: کنترل منفی، ردیف ۱۲، ۱۱، ۱۰، ۹، ۷، ۶، ۵، ۴، ۳، ۲: نمونه بالینی کوآگولاز مثبت، ردیف ۱۳: کنترل مثبت، ردیف ۸ و ۱۴: نمونه بالینی کوآگولاز منفی

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 13:33 +0330 on Saturday October 16th 2021

جدول (۲): نتایج خاصیت ضدمیکروبی آنتی‌بیوتیک ها بر *ا. اورئوس* و *کروموباکتریوم ویولاسئوم CV026* (انحراف معیار± میلی متر)

Staphylococcus aureus

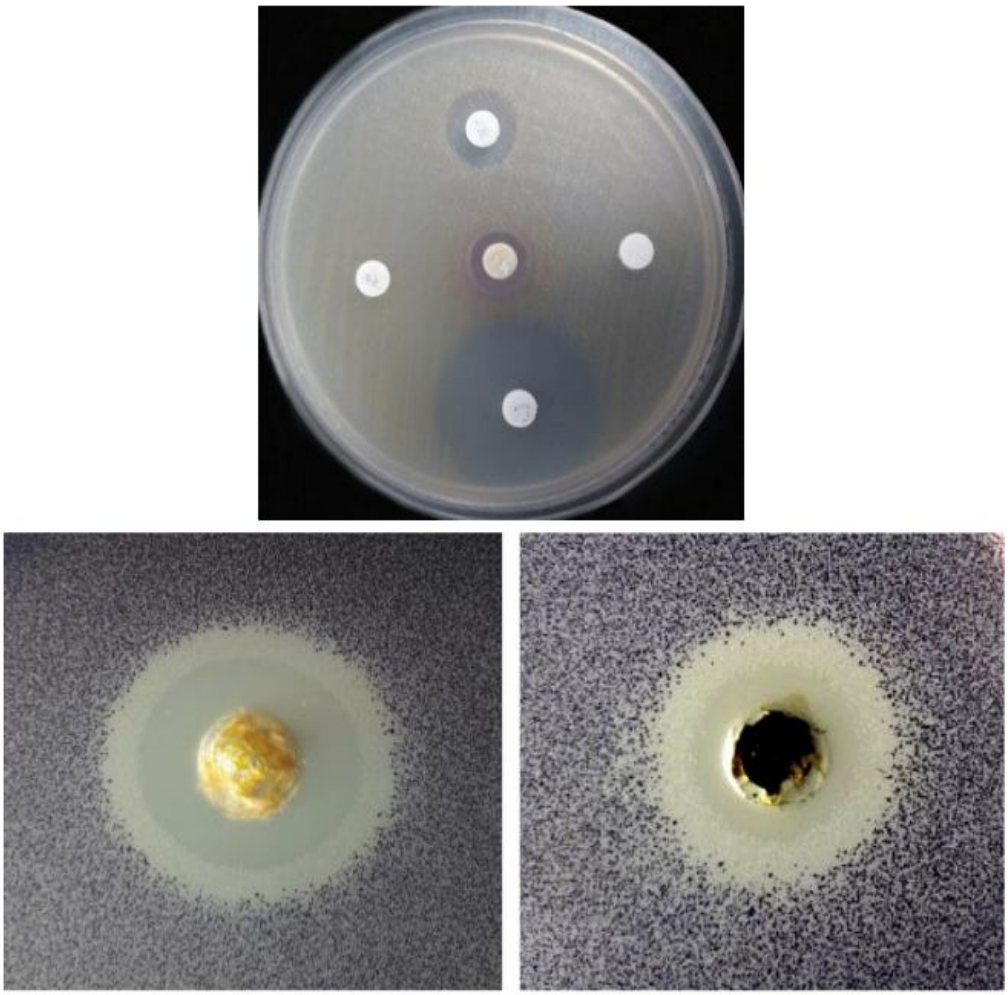
Antimicrobial Agent	DISK CONTENT	Interpretive Categories and Zone Diameter Breakpoints		
		S	I	R
Cefoxetin	30 µg	%50	-	%50
Erythromycin	15 µg	%80	%20	-
Linezolid	30 µg	%80	%10	
Quinopristin- dalfopristin	15 µg	%80	%20	-
Doxycycline	10 µg	%70	%30	-
Norfloxacin	10 µg	%60	%20	%20
Clindamycin	2 µg	%70	%30	-
Gentamicin	10 µg	%60	%20	%20
Chloramphenicol	30 µg	%90	%10	-
Penicillin	10 µg	%30	-	%70
Trimethoprim-sulfamethoxazole	1.25 23.75 µg	%50	%50	-
Nitrofourantoin	300 µg	%80	%20	-
Ciprofloxacin	5 µg	%60	%30	%10

R = Resistance
S = Sensetive

Chromobacterium violaceum
CV026

Antimicrobial Agent	DISK CONTENT	Zone Diameter	Interpretive Categories and Zone Diameter Breakpoints
Moxifloxacin	5 µg	42±0.5	S
Cefazolin	30 µg	-	R
Levofloxacin	5 µg	40.5±0.3	S
Ceftazidime	30 µg	19±0.4	R
Imipeneme	10 µg	22.5±0.4	S
Gatifloxacin	5 µg	30±0.5	S
Ampicillin	10 µg	-	R
Clindamycin	2 µg	19.5±0.3	S
Gentamicin	10 µg	27.5±0.6	S
Nalidixic acid	30 µg	35±0.2	S
Aztreonam	30 µg	-	R
Amoxicillin	25 µg	15±0.6	S
Nitrofourantoin	300 µg	31.5±0.4	S
Ciprofloxacin	5 µg	43.5±0.5	S

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 13:33 +0330 on Saturday October 16th 2021



شکل (۲): الف: تعیین حساسیت ضد میکروبی سویه *کروموباکتریوم ویولاسئوم CV026*. دیسک میانی: عصاره گل سرخ؛ دیسک بالایی: آموکسی سیلین، دیسک سمت راست: DMSO (کنترل منفی)، دیسک سمت چپ: سفازولین، دیسک پایینی: نیتروفورانتئین. ب: آزمون ارزیابی خاصیت ضد QS عصاره گل سرخ و استویا با استفاده از سویه *کروموباکتریوم ویولاسئوم CV026*. حلقه درونی و بیرونی اطراف چاهک به‌ترتیب مربوط به خاصیت ضد میکروبی و ضد QS می‌باشد. چاهک سمت راست: استویا و چاهک سمت چپ: گل سرخ

جدول (۳): طبقه بندی توانایی تشکیل بیوفیلم به روش میکروتیتر پلیت

توانایی تشکیل بیوفیلم	محاسبه میزان cut-off	نتایج حاصل از میانگین حداکثر جذب نور ([1]OD)
قوی	$OD > 4\times ODc$[2]	$OD > 0.33296$
متوسط	$2\times ODc < OD \leq 4\times ODc$	$0.16648 < OD \leq 0.33296$
ضعیف	$ODc < OD \leq 2\times ODc$	$0.08324 < OD \leq 0.16648$
عدم اتصال	$OD \leq 0.08324$	$OD \leq 0.08324$

[1]Optical density

[2]ODc = average of OD negative control + (3×SD of negative control)

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 13:33 +0330 on Saturday October 16th 2021

جدول (۴): توانایی تشکیل بیوفیلم جدایه‌ها در عدم حضور و حضور عصاره‌های استویا و گل سرخ ($P<0.05$) به روش MTP.

جدایه‌های ا. اورئوس	میزان جذب نور در عدم حضور عصاره (توانایی تشکیل بیوفیلم)	میزان جذب نور در حضور عصاره استویا در غلظت ۱۰ میکرولیتر	میزان جذب نور در حضور عصاره استویا در غلظت ۳۰ میکرولیتر	میزان جذب نور در حضور عصاره گل سرخ در غلظت ۱۰ میکرولیتر	میزان جذب نور در حضور عصاره گل سرخ در غلظت ۴۰ میکرولیتر
جدایه شماره ۱ تا ۱۰	$OD > 0.332$ (قوی)	$0.166<OD\leq0.332$ (متوسط)	$OD \leq 0.083$ (عدم اتصال)	$OD > 0.332$ (قوی)	$OD \leq 0.083$ (عدم اتصال)
	$0.166<OD\leq0.332$ (متوسط)	$0.083<OD \leq 0.16$ (ضعیف)	$OD \leq 0.083$ (عدم اتصال)	$0.166<OD\leq0.332$ (متوسط)	$OD \leq 0.083$ (عدم اتصال)
ا. اپیدرمیدیس (کنترل منفی)	$0.083<OD \leq 0.16$ (ضعیف)	$OD \leq 0.083$ (عدم اتصال)	$OD \leq 0.083$ (عدم اتصال)	$OD \leq 0.083$ (عدم اتصال)	$OD \leq 0.083$ (عدم اتصال)
ا. اورئوس ATCC 33591 (کنترل مثبت)	$OD > 0.332$ (قوی)	$OD > 0.332$ (قوی)	$OD \leq 0.083$ (عدم اتصال)	$OD > 0.332$ (قوی)	$OD \leq 0.083$ (عدم اتصال)
TSB(کنترل منفی)	$OD \leq 0.083$ (عدم اتصال)	$OD \leq 0.083$ (عدم اتصال)	$OD \leq 0.083$ (عدم اتصال)	$OD \leq 0.083$ (عدم اتصال)	$OD \leq 0.083$ (عدم اتصال)

جدول (۵): مهم‌ترین ترکیبات شناسایی شده در عصاره استویا و گل سرخ در آنالیز به روش GC-MSS

گل سرخ		استویا	
میانگین حجم (٪)	ترکیبات شناسایی شده	میانگین حجم (٪)	ترکیبات شناسایی شده
29.02	β-Citronellol	38.58	Camphor
16.28	Geraniol, trimethyl silyl ether	17.22	Furfural
14.84	β-Citronellol,trimethylsilyl ether	5.47	α-Pinenem
11.68	Nerol, trimethyl ether	4.95	Borneol
11.40	Geraniol	4.28	5-tert-Butyl-1,3-cyclopentadiene
1.43	Citronellyl formate	3.23	trans-2-Hexenal
1.28	Phenyl ethyl Alcohol	2.25	Terpinene-4-ol
0.87	Eugenol methyl ether	0.59	Alpha terpineol
0.37	trans, trans-Farnesol, trimethylsilyl ether	0.59	Sabinenem
0.27	Geranyl isobutyrate	0.35	Para-cymen-8-ol
0.24	Geranyl propionate	0.31	cis-3-Hexenal
0.25	Nerolidol	0.23	Thymol
0.08	Geranyl isobutyrate	0.22	Carveol 1
0.07	σCadinene	0.14	Linalol
0.01	Linalool	0.12	Alpha-terpinolene

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 13:33 +0330 on Saturday October 16th 2021

بحث و نتیجه‌گیری

Quorum Sensing یکی از مهم‌ترین ویژگی‌های رفتاری در باکتری‌ها می‌باشد که بیان ژن‌های حیاتی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. باکتری‌ها به‌واسطه‌ی این فرآیند، سیگنال‌های مولکولی تولید می‌کند که در ایجاد ارتباط با سایر سلول‌های موجود در محیط اطراف و دریافت پاسخ مناسب از آن بمنظور تولید فاکتورهای بیماری‌زایی بهره مند می‌شوند. یافتن هر گونه ترکیبات طبیعی با منشأ گیاهی و با قابلیت مهار این پدیده باکتریایی، می‌تواند به‌عنوان روشی نوین در کنترل طبیعی عوامل بیماریزا و کاهش آلودگی‌ها مطرح گردد (۱). مطالعه حاضر با هدف ارزیابی خاصیت ضد حساسیت جمعیتی دو گیاه گل سرخ و استویا با کمک مدل آزمایشگاهی *کروموباکتریوم ویولاسئوم CV026* انجام شد. سویه گزارشگر *CV026* با دریافت مولکول‌های آسیل هموسرین لاکتون (AHL) و تولید ویولاسئین با رنگدانه های بنفش، گویای فرآیند حساسیت جمعیتی است. نتایج این مطالعه حاکی بر اثر بازدارندگی فرآیند حساسیت جمعیتی با ممانعت از تجزیه ویولاسئین در سویه گزارشگر *کروموباکتریوم ویولاسئوم* CV026 به‌واسطه‌ی عصاره‌های گیاهی گل سرخ و استویا می‌باشد. عصاره گل سرخ و استویا علاوه بر خاصیت بازدارندگی QS دارای اثر ضد میکروبی نیز بودند. همچنین عصاره‌ها مانع از اتصال و تضعیف اتصال سلول‌های باکتریایی *استافیلوکوکوس اورئوس* به دیواره چاهک‌ها در پلیت الیزا شد که این مطلب گویای اثر ضد بیوفیلمی عصاره‌های مذکور می‌باشد. پدیده کوئوروم سنسینگ ازجمله واکنش‌های بیولوزی در ایجاد عفونت به‌واسطه فاکتورهای بیماری‌زایی باکتریایی می‌باشد. ازآنجایی‌که اکثر باکتری‌ها دچار مقاومت دارویی در اثر استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک ها شده‌اند پس می‌توان با دخالت و اثر ترکیبات طبیعی گیاهی به‌عنوان یک جایگزین خوب برای داروها و مواد شیمیایی در جهت پیشگیری و درمان علیه بیماری‌های باکتریایی به‌عنوان روشی نوین و کاربردی از عصاره گیاهان استفاده کرد.

در این راستا تحقیقاتی موجود می‌باشد که نشان می‌دهد برخی از گیاهان قادر به تولید ترکیباتی هستند که سیگنال‌های تولیدشده توسط باکتری‌ها در فرآیند کوئوروم سنسینگ را تحت تأثیر قرار داده و باعث بازدارندگی آن می‌شوند. واتم (Vattem) و همکاران در سال ۲۰۰۷ دریافتند که عصاره گیاه رزماری باعث کاهش میزان تولید ویولاسئین در *ک. ویولاسئوم CV026* و در نتیجه باعث مهار فرآیند QS می‌گردد (۱۶). مطالعه الوارز (Alvarez) و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان داد که گیاه چای دارای اثر ضد حساسیت جمعیتی بوده و باعث کاهش تولید میزان ویولاسئین در سویه *CV026* می‌گردد (۱۷). در این مطالعه تأثیر ضد QS عصاره‌های گل سرخ (۱۹ ±۰/۵ mm) و استویا (۱۷ ±۰/۵mm) با جلوگیری از تولید ویولاسین در سویه گزارشگر *کروموباکتریوم ویولاسئوم CV026* اثبات گردید. این گیاهان علاوه بر داشتن خاصیت ضدحساسیت جمعیتی، دارای خاصیت ضدمیکروبی بودند، به‌گونه‌ای که گل سرخ با تشکیل هاله بازدارندگی به قطر ۷/۴ ±۰/۵ میلی متر، سهم کم‌تری از خاصیت باکتری کشی را نسبت به استویا به قطر ۸/۸ ±۰/۳ میلی متر از خود بروز داد. بر اساس مطالعه براکمن (Brackman) و همکاران در سال ۲۰۱۵ نشان داد که بیوفیلم های ایجاد شده توسط باکتری‌ها، با ۸۰ درصد از عفونت‌ها مرتبط هستند و رشد باکتری‌ها در ساختار بیوفیلم، باعث ایجاد مقاومتشان در برابر انواعی از عوامل ضد بیوفیلم می‌گردد که با مهار فرآیند حساسیت جمعیتی، می‌توان از تشکیل ساختار بیوفیلم جلوگیری به عمل آورد (۱۸). در این تحقیق عصاره‌های گل سرخ و استویا هر دو مانع تولید بیوفیلم جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* شدند. مطالعه کومار (Kumar) و همکاران در سال ۲۰۱۴ نشان داد که ماده Gingerol-۶ در گیاه زنجبیل مانع تشکیل ویولاسئین و پیوسیانین در *C. violaceum* و *P. aeruginosa* می‌گردد (۱۹). مطالعه الوارز (Alvarez) و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان داد ترکیباتی همچون Thymol، Linalool، Geraniol، Nerol، Camphene، Camphor و Camphor در گیاهان باعث بازدارندگی تولید ویولاسئین و در نتیجه مهار QS می‌شوند (۱۷). همچنین بر اساس تحقیقات تاپیا (Tapia) و همکاران در سال ۲۰۱۷ دریافتند ترکیباتی ترپنی موجود در گیاهان مانند سینامالدئید، یوژنول و ۴۹-سیترونلول دارای خاصیت بازدارندگی حساسیت جمعیتی در سویه *کروموباکتریوم ولاسئوم 46* شدند (۶). در تحقیق حاضر، نتایج حاصل از آنالیز GC-MASS عصاره‌ها حضور ترکیبات مؤثری مانند Furfural، Terpinen-4-ol، Linalool و α-Pinenemدر استویا و ترکیباتی همچون Geraniol، Nerol، β-Citronellol و Eugenol در گل سرخ مشاهده و شناسایی گردید. لذا با استناد به مطالعات یاد شده، اثرات ناشی از خاصیت ضد QS عصاره‌های استویا و گل سرخ می‌تواند مرتبط با حضور ترکیبات فوق باشند.

در این مطالعه به دلیل تحریم بودن کشور در جهت تهیه سویه *کروموباکتریوم ویولاسئوم CV026* و سیگنال (HSL C12)، همچنین کوتاه بودن مدت‌زمان گلدهی گیاهان مذکور و هزینه بر بودن استخراج مواد مؤثره گیاهان بصورت خالص به روش HPLC با محدودیت و مشکلات فراوانی مواجه بودیم.

این پژوهش نشان داد که عصاره‌های گل سرخ و استویا علاوه بر خاصیت ضد میکروبی، دارای ویژگی ضد حساسیت جمعیتی بر جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جمعیتی نیز می‌باشند. ازاین‌رو با انجام مطالعات تکمیلی، می‌توان با ارزیابی دقیق میزان ترکیبات

مؤثر در این گیاهان در جهت کنترل و پیشگیری از عفونت‌های ایمپلنت دندانی، به‌عنوان داروهای گیاهی استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از خانم دکتر حکیمه دژکام، هیئت علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم، به دلیل همکاری صمیمانه در جهت شنا سایی گیاهان بکار رفته در این پژوهش کمال امتنان را دارند. همچنین این مطالعه با بودجه شخصی نویسندگان مقاله انجام شده و تحت حمایت مادی و معنوی هیچ موسسه‌ای نبوده است.

References:

1. Makhfian M, Hassanzadeh N, Mahmoudi E, Zandyavari N. Anti-quorum Sensing Effetcs of Ethanolic Crude Extract of Anethum graveolens L. J Essent Oil Bear Pl 2015;18(3): 687-96.
2. Husain FM, Ahmad I, Al-thubiani AS, Abulreesh HH, AlHazza IM, Aqil F. Leaf extracts of Mangifera indica L. Inhibit quorum sensing–regulated production of virulence factors and biofilm in test bacteria. Front Microbiol 2017;8: 727.
3. Rul F, Monnet V. How microbes communicate in food: a review of signaling molecules and their impact on food quality. Curr Opin Food Sci 2015;2:100–105.
4. LaSarre B, Federle MJ. Exploiting quorum sensing to confuse bacterial pathogens. Microbiol Mol Biol Rev 2013;77(1):73–111.
5. Roy R, Tiwari M, Donelli G, Tiwari V. Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. Virulence 2018;9(1):522–54.
6. Tapia-Rodriguez MR, Hernandez-Mendoza A, Gonzalez-Aguilar GA, Martinez-Tellez MA, Martins CM, Ayala-Zavala JF. Carvacrol as potential quorum sensing inhibitor of Pseudomonas aeruginosa and biofilm production on stainless steel surfaces. Food Control 2017;75: 255-61.
7. Ponnusamy K, Paul D, Kweon JH. Inhibition of quorum sensing mechanism and Aeromonas hydrophila biofilm formation by vanillin. Environ Engin Sci 2009;26(8):1359–63.
8. Bodini SF, Manfredini S, Epp M, Valentini S, Santori F. Quorum sensing inhibition activity of garlic extract and p-coumaric acid. Lett Appl Microbiol 2009;49(5):551–5.
9. Packiavathy IA, Priya S, Pandian SK, Ravi AV. Inhibition of biofilm development of uropathogens by curcumin–an anti-quorum sensing agent from Curcuma longa. Food Chem 2014;148: 453-60.
10. Kim H-S, Lee S-H, Byun Y, Park H-D. 6-Gingerol reduces Pseudomonas aeruginosa biofilm formation and virulence via quorum sensing inhibition. Sci Rep 2015;5:8656.
11. Packiavathy IASV, Agilandeswari P, Musthafa KS, Pandian SK, Ravi AV. Antibiofilm and quorum sensing inhibitory potential of Cuminum cyminum and its secondary metabolite methyl eugenol against Gram negative bacterial pathogens. Food Res Int 2012;45(1):85–92.
12. Stephan R, Annemüller C, Hassan AA, Lämmler C. Characterization of enterotoxigenic Staphylococcus aureus strains isolated from bovine mastitis in north-east Switzerland. Vet Microbiol 2001;78(4):373–82.
13. Adonizio AL. Anti-quorum sensing agents from South Florida medicinal plants and their attenuation of Pseudomonas aeruginosa pathogenicity. 2008;
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. Goudarzi M, Mehrabi M. A Study on the Prevalence of IS256 Insertion Sequence and Biofilm Formation in Staphylococcus Epidermidis

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 13:33 +0330 on Saturday October 16th 2021

Isolated from Healthy Human Skin. Scientific journal of ilam university of medical sciences 2018;26(1):85–93.

16. Vattem DA, Mihalik K, Crixell SH, McLean RJC. Dietary phytochemicals as quorum sensing inhibitors. Fitoterapia 2007;78(4):302–310.
17. Alvarez MV, Moreira MR, Ponce A. Antiquorum sensing and antimicrobial activity of natural agents with potential use in food. J Food Saf 2012;32(3):379–387.
18. Brackman G, Coenye T. Quorum sensing inhibitors as anti-biofilm agents. Current pharmaceutical design 2015;21(1):5–11.
19. Kumar R, Sharma S, Sood S, Agnihotri VK, Singh V, Singh B. Evaluation of several Rosa damascena varieties and Rosa bourboniana accession for essential oil content and composition in western Himalayas. J Essen Oil Res 2014;26(3):147–52.

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 13:33 +0330 on Saturday October 16th 2021

Original Article

INHIBITORY EFFECT OF *STEVIA* AND *ROSA* EXTRACTS AGAINST BACTERIAL QUORUM SENSING

Milad Makhfian[1], Elham Pishgar [2]*

Received: 17 Apr, 2019; Accepted: 23 Jul, 2019

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 13:33 +0330 on Saturday October 16th 2021

Abstract

Background & Aims: Quorum Sensing is a mechanism by which orchestrate the expression of many genes in bacteria. Therefore, any interference with the system will inhibit bacterial infections. The principal purpose of the research was to evaluate the potential of anti-quorum sensing of *Rosa damascena* and *Stevia rebaudiana* against *Staphylococcus aureus*.

Materials & Methods: Ten isolates of Staphylococcus aureus were collected and identified. Plant species were collected from gardens of Fars province and extracted using 96% ethanol. The effect of anti-QS properties of the plant extracts was evaluated using Chromobacterium Violaceum CV026 biosensor. Furthermore, Biofilm production of the strains was investigated through the microtiter plate. In addition, the phytocompounds of Rosa and Stevia were identified by GC-MASS.

Results: The results showed that Rosa damascene (19±0.5) and Stevia rebaudiana (17±0.5) extracts significantly ($P<0.05$) possess anti-QS activities. Moreover, both extracts had antimicrobial activity and anti-biofilm properties. The results of the GC-MASS analysis also disclosed that the extract of rosa contains compounds such as Geraniol, β-Citronellol and Linalool, and also the extract of Stevia has compounds similar to Furfural, Terpinen-4-ol, Linalool, and α-Pinenem which could interfere with bacterial QS.

***Conclusion*:** According to the anti-biofilm and anti-QS properties of Rosa and Stevia extracts, the active compounds of the extracts, with an accurate evaluation, could be considered as an appropriate approach for bacterial treatment.

Keywords: QS, AHL, anti-quorum sensing, *Chromobacterium violaceum* CV026.

Address: Department of Microbiology, Islamic Azad University, Jahrom, Fars, Iran.
Tel: +98 9164877040
Email: Elhampishgar1504@gmail.com

SOURCE: URMIA MED J 2019: 30(6): 453 ISSN: 1027-3727

[1] *Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran (Corresponding Author)*
[2] *Department of Plant Pathology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran*