مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره ۲۲، شماره ۴، مهر و آبان ۱۳۹۳
صفحه: ۱۳۷۰-۱۳۵۸

Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol. 22, No. 4, Sep-Oct 2014
Pages: 1358-1370

بررسی اثربخشی عصاره‌های الکلی گیاه Centaurea cyanus بر فرم منفرد و بیوفیلمی شش باکتری پاتوژن

زینب محسنی‌پور[۱]، مهدی حسن‌شاهیان[*۲]

۱- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه شهید باهنر، کرمان، ایران
۲- استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشگاه شهید باهنر، کرمان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۰/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۵/۲۳

چکیده

مقدمه: امروزه گسترش سویه‌های میکروبی مقاوم به دارو موجب شده تا مقابله با بیماری‌های عفونی دشوارتر گردد. از دلایل مهم بروز مقاومت‌های دارویی، جایگیری میکروارگانیسم‌ها در ساختاری به نام بیوفیلم است. بیوفیلم‌ها از تجمع میکروارگانیسم‌ها بر سطوح مختلف ایجاد می‌شوند. از این جهت دستیابی به ترکیبات ضدمیکروبی نوین در مقابله با این ساختارها ضروری است. در این مطالعه تحقیقاتی خواص ضدمیکروبی گیاه Centaurea cyanus بر فرم منفرد و بیوفیلمی شش باکتری پاتوژن (استافیلوکوکوس ارئوس، باسیلوس سرئوس، استرپتوکوکوس پنومونیه، پسودوموناس آئروژینوزا، اشرشیاکلی و کلبسیلا پنومونیه) بررسی گردید.

روش بررسی: اثربخشی عصاره‌های اتانولی و متانولی C.cyanus بر فرم منفرد با آزمون انتشار دیسک تعیین و مقادیر MIC و MBC به روش ماکروبراث دایلوشن به دست آمد. اثرات ضدبیوفیلمی عصاره‌های C.cyanus نیز با روش میکروتیتر پلیت بررسی گردید.

نتایج: در این بررسی قابلیت عصاره‌های گیاه گل‌گندم در مهار فرم منفرد و بیوفیلمی باکتری‌های انتخابی تأیید و مشخص گردید که نوع اتانولی عصاره در مهار فرم منفرد کارآمدتر 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 باکتری‌های اشرشیاکلی (۸۴/۲۶٪) و استرپتوکوکوس پنومونیه (۸۳/۱۴٪) مشاهده گردید. در تیمار با عصاره‌های C.cyanus، استرپتوکوکوس پنومونیه (۷۵/۶۶٪) بیشترین تخریب ساختارهای بیوفیلمی را نشان داده و بیشترین کاهش در فعالیت متابولیکی بیوفیلم‌ها در در استافیلوکوکوس ارئوس (۷۱/۸۵٪) مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: بر اساس یافته‌های حاصل قابلیت بالای عصاره‌های C. cyanus در مقابله با میکروارگانیسم‌های انتخابی تأیید و این عصاره‌ها به عنوان گزینه مناسبی در مقابله با سویه‌های مذکور پیشنهاد گردیدند.

واژه‌های کلیدی: بیوفیلم، Centaureacyanus، باکتری پاتوژن، اثر ضدمیکروبی

[*](نویسنده مسئول)؛ تلفن: ۰۳۴۱-۳۲۲۲۰۶۷؛ پست الکترونیکی: mshahi@uk.ac.ir

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-11-26]

مقدمه

امروزه بهره‌گیری گسترده از مشتقات گیاهی در حوزه درمان، موید قابلیت بالای ترکیبات مذکور در مقابله با بیماری‌های مختلف است. گیاهان توانایی بی‌مانندی در سنتز ترکیبات آروماتیک دارند که از مهمترین این ترکیبات می‌توان به فنل‌ها، پلی‌فنل‌ها، کوئینون‌ها، فلاونوئیدها، تانن‌ها و ترپنوئیدها اشاره نمود که طی پژوهش‌های متعدد خواص درمانی بسیاری برای این مشتقات ذکر گردیده است(۱). بسیاری از مطالعات مذکور بر خواص ضدمیکروبی گیاهان دارویی و به منظور دستیابی به ترکیبات مهارکننده میکروارگانیسم‌ها انجام شده است. سابقه مصرف طولانی مدت گیاهان در طب سنتی، ماهیت طبیعی، دسترسی ساده و کم هزینه، عدم بروز مشکلات زیست محیطی و مقبولیت عام بهره‌گیری از گیاهان دارویی از جمله مزایایی هستند که این ترکیبات زیستی را به گزینه‌های بسیار مناسبی در مطالعات انجام شده به منظور مهار سویه‌های میکروبی مطرح کرده است(۲).

با توجه به ظهور و گسترش روز افزون مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در میان میکروارگانیسم‌های پاتوژن و دشواری درمان بیماری‌های عفونی سویه‌های مقاوم، ضرورت دستیابی به ترکیبات ضدمیکروبی جدید تبیین می‌گردد(۳). مقاومت دارویی در میکروارگانیسم‌ها به دلایل مختلف بروز می‌کند که یکی از مهمترین آنها قرارگیری سلول‌های میکروبی در ساختاری به نام بیوفیلم است. یک بیوفیلم ساختار سه بعدی و پیچیده‌ای از سلول‌های میکروبی سازمان یافته در ماتریکسی از پلیمرهای خارج سلولی است که بر سطوح مختلف تشکیل می‌شود(۴). ماتریکس یک بیوفیلم موجب نفوذ آرام و ناکافی ترکیبات ضدمیکروبی شده و گرادیان‌های غلظتی موجود در نقاط مختلف آن قادر به خنثی‌سازی برخی ترکیبات راه یافته به درون بیوفیلم می‌گردد. از طرف دیگر بیان برخی ژن‌های مرتبط با مقاومت‌های دارویی در بیوفیلم افزایش یافته و همچنین کاهش فعالیت متابولیکی سلول‌های میکروبی در بیوفیلم خود از عملکرد مناسب ماده ضدمیکروبی بر این میکروارگانیسم‌ها می‌کاهد(۵،۶). از آنجا که تشکیل بیوفیلم‌های میکروبی بر سطوح مختلف تجهیزات صنعتی و پزشکی موجب بروز مشکلات بسیاری شده، دستیابی به راه‌های نوین مقابله با ساختارهای بیوفیلمی ضروری است(۷).

گیاه گل‌گندم با نام علمی Centaurea cyanus متعلق به خانواده Asteraceae می‌باشد که اغلب در مزارع گندم و غلات می‌روید و وجه تسمیه آن نیز به همین دلیل است. این گیاه بومی آسیا و اروپا بوده و در ایران نیز در اغلب نقاط کشور مشاهده می‌شود. گیاه گل‌گندم دارای موسیلاژ، مواد مومی، تانن، آنتوسیانین، فلاونوئید، مشتقات مختلف فنلی، پتاسیم، منگنز، اسیدفسفریک و سنتورین بوده و حضور همین مواد موجب شده تا تمامی قسمت‌های این گیاه اثر دارویی داشته باشند. گل‌گندم تقویت‌کننده، تصفیه‌کننده خون، تب‌بر و مسهل بوده و در طب سنتی از آن برای رفع التهابات پلک، شست و شوی چشم، درمان یبوست، سرماخوردگی و یرقان استفاده می‌شود(۸،۹). در مطالعات بسیاری اثر ضدمیکروبی گونه‌های مختلف گیاه گل‌گندم بر میکروارگانیسم‌های پاتوژن تأیید شده است. برای مثال مشخص شده عصاره گیاه C. cariensis قادر است باکتری‌های استافیلوکوکوس ارئوس، باسیلوس سرئوس و اشرشیاکلی را به طرز قابل توجهی مهار کند(۱۰). در مطالعه دیگری نیز اثر مهاری C. austro-anatolica بر سویه‌های مقاوم به دارو استافیلوکوکوس ارئوس، باسیلوس سوبتیلیس و کاندیدا تروپیکالیس تأیید شده است. در این مطالعه بیشترین ترکیبات موجود در عصاره‌های کلروفرمی گیاه مذکور کاریوفیلن اکساید (caryophyllene oxide)، اسپاتولنول (spathulenol)، n- تریکوزانول (n-tricosanol) و ژرانیل ایزووالرات (geranylisovalerate) شناسایی شده است(۱۱). در بررسی دیگری که به منظور شناسایی ترکیبات مؤثره عصاره‌های دی‌اتیل اتری گونه C. cyanus انجام گردیده است، مشخص شده که اغلب ترکیبات از نوع نورایزوپرنوئید می‌باشند. از جمله این ترکیبات می‌توان به ۳-اکسو-رترو-آلفا اینول (3-oxo-retro-α-ionol)، متیل سرینژات (methylsyringate) و ۳-هیدروکسی-۴ فنیل بوتان- ۲- وان

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-11-26]

(3-hydroxy-4-phenylbutan-2-one) اشاره نمود(۱۲).

بررسی‌های انجام شده بر خواص ضدمیکروبی گیاه گل‌گندم بیشتر با تکیه بر فرم منفرد میکروارگانیسم‌ها بوده و توجه کمتری به ساختارهای بیوفیلمی شده است. از این جهت در این پژوهش علاوه بر بررسی قابلیت عصاره‌های الکلی C.cyanus در مهار فرم منفرد شش باکتری پاتوژن انتخابی، برای نخستین بار قابلیت عصاره‌های مذکور در مهار پدیده تشکیل بیوفیلم، تخریب ساختارهای بیوفیلمی و مهار فعالیت آنزیم دهیدروژناز سلول‌های موجود در این ساختارها مورد مطالعه قرار گرفت. میکروارگانیسم‌های مورد بررسی در این پژوهش شامل سه باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس ارئوس، باسیلوس سرئوس و استرپتوکوکوس پنومونیه و سه باکتری گرم منفی پسودوموناس آئروژینوزا، اشرشیاکلی و کلبسیلا پنومونیه هستند. تمامی باکتری‌های نامبرده از پاتوژن‌های مهم انسانی محسوب می‌شوند که در دهه‌های اخیر با کسب مقاومت‌های دارویی مشکلات بسیاری را ایجاد نموده‌اند.

روش بررسی

در این مطالعه که یک بررسی تحقیقاتی همراه با کار آزمایشگاهی می‌باشد، گیاه گل‌گندم از مراتع طبیعی رشد خود و از حومه شهر کرمان جمع‌آوری شده و در هرباریوم دانشکده علوم دانشگاه شهید باهنر از نظر علمی شناسایی گردید. ساقه، برگ و گل‌های گیاه به مدت ۲ هفته در سایه خشک و سپس به کمک آسیاب برقی و الک تا حد ممکن پودر شدند. به منظور تهیه عصاره‌های الکلی مقدار ۵۰ گرم از پودر C. cyanus به ترتیب به ارلن‌های حاوی ۵۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد و ۵۰۰ میلی‌لیتر متانول ۹۶ درصد وارد و درب ارلن‌ها با ورقه آلومینیومی کاملا بسته شد. جهت بهبود فرآیند عصاره‌گیری ارلن‌ها به دستگاه شیکر با سرعت ۱۸۰ دور در دقیقه و دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۲۴ ساعت منتقل شدند. سپس محتویات هر ارلن برای حذف قطعات اضافی، از کاغذ صافی عبور داده شده و محلول حاصل جهت تبخیر حلال به دستگاه روتاری انتقال یافت.پس از این ماده حاصله در آون ۴۰ درجه سانتی‌گراد به پودر خشک عصاره تبدیل و مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم از آن در حجم مناسبی از دی متیل سولفوکساید (حدود ۳۰۰ میکرولیتر) حل و با عبور از فیلتر میلی‌پور استریل گردید. سپس این محلول با افزودن آب مقطر استریل به حجم ۱ میلی‌لیتر رسانده شده و به عنوان محلول ذخیره عصاره (۱۰۰mg/ml) تا زمان مصرف در ظروف شیشه‌ای استریل و تیره در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد(۱۳).

ارزیابی قابلیت مهاری عصاره‌های C. cyanus بر باکتری‌های گرم مثبت استافیلوکوکوس ارئوس، باسیلوس سرئوس و استرپتوکوکوس پنومونیه و همچنین باکتری‌های گرم منفی پسودوموناس آئروژینوزا، اشرشیاکلی و کلبسیلا پنومونیه انجام شد. استافیلوکوکوس ارئوس، اشرشیاکلی 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 بود و از دانشکده دامپزشکی دانشگاه باهنر تهیه گردید. پسودوموناس آئروژینوزا نیز سویه جداشده از خاک بود و از دانشکده علوم دانشگاه باهنر تهیه شد. کشت مرجع میکروارگانیسم‌های مذکور در یخچال نگهداری شده و هر ماه در نوترینت آگار تجدید کشت گردید. در مورد استرپتوکوک پنومونیه از محیط بلاد آگار استفاده شد.

خواص ضدمیکروبی گیاه C. cyanus بر فرم منفرد میکروارگانیسم‌های مورد بررسی به کمک آزمون انتشار دیسک سنجیده شد. از آنجا که اغلب عصاره‌های گیاهی در غلظت‌های بالا (به ویژه در آزمون انتشار دیسک) اثر مهاری خود را نشان می‌دهند و از آنجا که جذب دیسک‌های بلانک کم بوده و انتشار عصاره از آنها نیز در بسیاری از موارد محدود است و با توجه به غلظت‌های انتخابی پژوهش‌های مشابه که بر گونه‌های مختلف گیاه گل‌گندم انجام شده بود؛ برای آغشته نمودن دیسک‌های بلانک به عصاره از غلظت ۱۰۰ mg/ml استفاده گردید.

در ابتدا ۵ عدد دیسک بلانک استریل به مدت دو ساعت در محلول ذخیره عصاره (۱۰۰mg/ml) وارد و سپس به منظور حذف حلال اضافی، دیسک‌ها در شرایط آسپتیک به پلیت استریل منتقل و در آون ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند(۱۴). در این بررسی دیسک آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل (۳۰ µg/disc)

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-11-26]

شاهد مثبت آزمایش بوده و دیسک‌های آغشته به اتانول، متانول و دی متیل سولفوکساید به منظور کنترل دیسک‌ها به کار رفتند.

جهت انجام آزمون انتشار دیسک، کشت ۲۴ ساعته از محیط مرجع هر باکتری در محیط نوترینت تهیه و پس از آن هر سوسپانسیون تا رسیدن به کدورتی معادل ۰/۵ مک فارلند (0.5 Mc farland) رقیق گردید. از این سوسپانسیون‌ها به کمک سوآب استریل در محیط مولر هینتون آگار کشت سفره‌ای انجام شده و سپس در شرایط آسپتیک دیسک‌های آغشته به عصاره، حلال و آنتی‌بیوتیک به آرامی و با فواصل منظم بر سطح هر پلیت قرار گرفتند. پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شده و قطر هاله‌های مهاری هر دیسک با خط‌کش میلی‌متری اندازه‌گیری گردید(۱۵).

حداقل غلظت مهارکننده (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) عصاره‌های C. cyanus طبق پروتکل (CLSI: The Clinical and Laboratory Standards Institute) و با روش ماکروبراث دایلوشن تعیین شد(۱۳). در ابتدا ده غلظت به شیوه‌ی رقیق سازی متوالی(۱۶) از محلول ذخیره عصاره تهیه و مورد استفاده قرار گرفت. برای این منظور به ده لوله آزمایش استریل مقدار ۱ میلی‌لیتر محیط نوترینت براث استریل افزوده و به لوله اول ۱ میلی‌لیتر از محلول ذخیره عصاره وارد شد. محتویات لوله‌ی مذکور به خوبی مخلوط گردید تا غلظت نهایی عصاره در آن برابر mg/ml ۵۰ شود. سپس ۱ میلی‌لیتر از این محلول در شرایط آسپتیک به لوله دوم منتقل و به خوبی مخلوط شد تا غلظت عصاره نصف لوله اول و برابر ۲۵mg/ml گردد. غلظت‌های سوم تا دهم عصاره نیز به همین ترتیب در لوله‌های بعدی تهیه شد.

پس از این به هر غلظت ۱ میلی‌لیتر از کشت ۲۴ ساعته باکتری در محیط نوترینت براث که کدورتی معادل ۰/۵ مک‌فارلند داشت، اضافه شد، از این جهت غلظت نهایی محلول‌های عصاره ۲۵mg/ml-۰/۰۱در نظر گرفته شد. لوله‌های کنترل مثبت در این آزمون حاوی سوسپانسیون میکروبی و آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین (۲mg/ml)، لوله‌های کنترل منفی حاوی سوسپانسیون میکروبی و آب مقطر استریل و نهایتاً لوله‌های شاهد عصاره حاوی غلظت مورد نظر از عصاره و محیط نوترینت براث بودند. در نهایت لوله‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ ساعت انکوبه شده و با مقایسه کدورت ایجاد شده در لوله‌های آزمون با کدورت کنترل منفی و شاهد عصاره، کمترین غلظتی که رشد باکتری در آن مهار شده بود به عنوان MIC انتخاب گردید.

برای محاسبه حداقل غلظت کشندگی(Minimum Bactericidal Concentration, MBC) عصاره‌های گیاه گل‌گندم از لوله‌های آزمون MIC، در محیط مولر هینتون آگار فاقد عصاره گیاهی کشت انجام و کمترین غلظتی که باکتری در آن رشد نکرد به عنوان MBC انتخاب شد.

قابلیت عصاره‌های C. cyanus در مهار پدیده تشکیل بیوفیلم باکتری‌های انتخابی با روش میکروتیتر پلیت سنجیده شد. در ابتدا یک کشت ۱۸ ساعته از محیط مرجع هر باکتری در محیط تریپتیکاز سوی براث(Tryptic Soy Broth: TSB) تهیه و تا رسیدن به کدورتی معادل ۱ مک فارلند رقیق گردید. در این آزمون اثر مهاری سه غلظت ۲۰mg/ml-۵ از عصاره‌های C. Cyanus که به روش رقیق‌سازی متوالی و با افزودن TSB استریل به محلول ذخیره عصاره تهیه شده بودند، مورد بررسی قرار گرفت. نخست به چاهک‌های آزمون میکروپلیت ۹۶ خانه، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از هر غلظت عصاره در شرایط آسپتیک وارد و سپس به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتریایی افزوده شد. در نهایت میکروپلیت به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، بدون حرکت انکوبه گردید. در این آزمون چاهک کنترل مثبت، کنترل منفی و چاهک شاهد عصاره همانند آزمون تعیین MIC در نظر گرفته شدند(۱۷).

اثر مهاری غلظت‌های مختلف عصاره پس از انکوباسیون به کمک رنگ‌آمیزی کریستال ویوله تعیین شد. برای این منظور محتویات هر چاهک به آرامی آسپیره و سپس دو مرتبه با بافر سالین فسفات شسته شد. پس از این ۱۵۰ میکرولیتر متانول به مدت ۱۵ دقیقه جهت تثبیت ساختارهای بیوفیلمی به چاهک‌ها افزوده گردید. بعد از آسپیره‌ی متانول، ۲۰۰ میکرولیتر رنگ

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-11-26]

کریستال و یوله ۱ درصد به چاهک‌ها وارد و میکروپلیت به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. رنگ اضافی با جریان آرام آب شیر از چاهک‌ها شسته شده و پلیت در دمای اتاق خشک گردید. جذب نوری هر چاهک پس از افزودن ۱۶۰ میکرولیتر اسید استیک گلاسیال ۳۳ درصد با دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۶۳۰ نانومتر معین شد(۱۸).

درصد مهار تشکیل پدیده تشکیل بیوفیلم در تیمار با عصاره‌های C. cyanus به کمک فرمول زیر محاسبه شد(۱۹):

$$\text{Inhibition percent} = 10 \frac{(C-B)-(T-E)}{(C-B)}$$

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 می‌باشد.

جهت تعیین قابلیت عصاره‌های C.cyanus در تخریب ساختارهای بیوفیلمی، ابتدا بیوفیلم هر باکتری تشکیل و سپس غلظت‌های انتخابی عصاره (۲۰-۵mg/ml) بر این ساختارها اثر داده شد. در این آزمون نیز چاهک کنترل مثبت، کنترل منفی و چاهک شاهد عصاره همانند آزمون تعیین MIC در نظر گرفته شدند. به منظور تشکیل بیوفیلم، ۱۰۰ میکرولیتر از کشت ۱۸ ساعته باکتری‌ها در محیط TSB با کدورتی معادل ۱ مک‌فارلند به چاهک‌های آزمون و کنترل منفی میکروپلیت وارد و پس از آن پلیت بدون حرکت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید. در میکروپلیت مذکور به چاهک‌های شاهد محیط کشت و شاهد عصاره این میکروپلیت نیز ۱۰۰ میکرولیتر محیط TSB استریل افزوده شده بود. پس از انکوباسیون، محتویات چاهک‌ها در شرایط آسپتیک آسپیره و چاهک‌ها دو مرتبه با بافر سالین فسفات شسته شدند تا سلول‌های پلانکتونیک موجود در هر چاهک حذف گردد. سپس مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های انتخابی عصاره به چاهک‌های آزمون و شاهد عصاره افزوده و پلیت برای ۲۴ ساعت دیگر در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و بدون حرکت انکوبه گردید(۲۰). پس از انکوباسیون میزان تخریب ساختارهای بیوفیلمی با روش رنگ‌آمیزی کریستال ویوله بررسی و درصد تخریب ساختارهای مذکور به کمک فرمولی که پیش‌تر اشاره شد، محاسبه گردید.

به منظور تعیین قابلیت مهاری عصاره‌های گیاه گل‌گندم بر فعالیت آنزیم دهیدروژناز سلول‌های میکروبی جدا شده از ساختار بیوفیلم، ابتدا ساختارهای بیوفیلمی تشکیل و سپس غلظت‌های انتخابی عصاره (۲۰-۵mg/ml) بر این ساختارها اثر داده شد. به عبارت دیگر این بررسی نشان می‌دهد که چه تعداد از سلول‌های میکروبی که در تیمار با عصاره‌های C. cyanus از ساختار بیوفیلم جدا شده‌اند، زنده و دارای فعالیت هستند و چه تعداد در مجاورت عصاره فعالیت خود را از دست داده‌اند. پس از گذشت زمان انکوباسیون مقدار ۵۰ میکرولیتر از رنگ TTC: Triphenyl Tetrazolium Chloride به چاهک‌های میکروپلیت افزوده و سپس پلیت به مدت سه ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. پس از این مدت جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ۴۹۰ نانومتر تعیین شده و درصد مهار فعالیت متابولیکی سلول‌ها نیز به کمک فرمولی که پیش از این اشاره شد، مشخص گردید(۷).

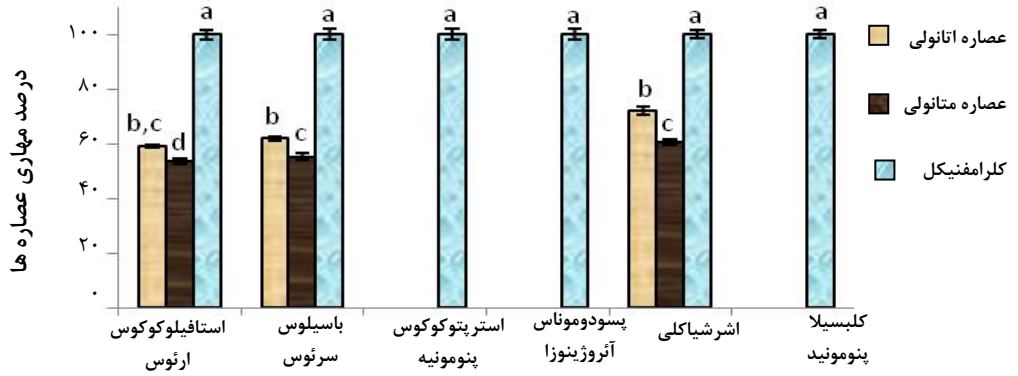
کلیه آزمون‌ها در این پژوهش با سه تکرار انجام شد، اختلاف بین داده‌ها با آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) و با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۸ مقایسه گردید و سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. سپس اختلافات حقیقی بین گروه‌ها در آزمون انتشار دیسک به کمک تست Duncan بررسی گردید. در آزمون‌های انجام شده بر ساختارهای بیوفیلمی به علت عوامل متعدد مؤثر در آزمایش و فزونی داده‌ها، از ذکر دسته‌بندی‌های آزمون مذکور صرف نظر شده و اثرات متقابل عوامل مؤثر در هر آزمایش با آزمون LSD بررسی شد.

نتایج

قطر هاله‌های مهاری هر یک از عصاره‌های اتانولی و متانولی C. cyanus در نمودار ۱ و مقادیر MIC و MBC عصاره‌های مذکور در جدول ۱ آمده است. بر اساس مشاهدات این بررسی

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-11-26]

قدرت مهاری عصاره‌های اتانولی بر فرم منفرد در سطح معنی‌داری ۵ درصد بیشتر از نوع متانولی آن می‌باشد($p<۰/۰۵$). در آزمون انتشار دیسک عصاره‌های گیاه گل‌گندم قادر به مهار باکتری‌های استافیلوکوکوس ارئوس، باسیلوس سرئوس و اشرشیاکلی در سطح معنی‌داری ۱ درصد بوده ($p<۰/۰۱$) و این در حالی است که عصاره‌های مذکور قادر به تشکیل هاله مهاری بر کشت سایر باکتری‌های مورد بررسی نبودند. بزرگترین هاله مهاری در آزمون مذکور بر باکتری‌های اشرشیاکلی تشکیل شد. در محیط مایع بکار رفته در آزمون MIC عصاره‌های C. cyanus در غلظتی (۰/۳۹-۳/۱۲mg/ml) بسیار کمتر از غلظت دیسک‌های تهیه شده، قادر به مهار تمامی باکتری‌های مورد بررسی بودند. در این آزمون بیشترین حساسیت به عصاره‌های گیاه گل‌گندم در باکتری استافیلوکوکوس ارئوس و کمترین حساسیت در باکتری استرپتوکوکوس پنومونیه مشاهده گردید.



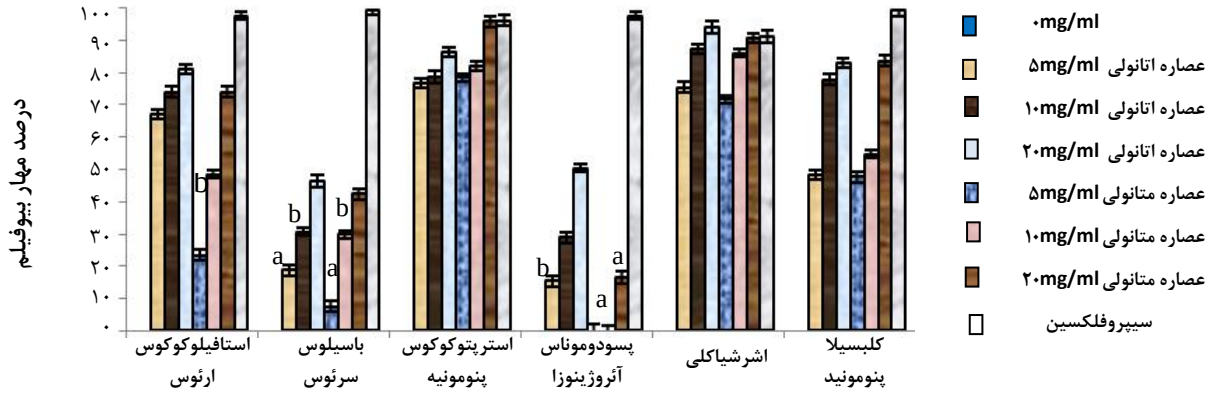
نمودار ۱. مقایسه درصد مهاری عصاره‌های گیاه گل‌گندم و آنتی‌بیوتیک شاهد در آزمون انتشار دیسک.
حروف مشابه a, b, c, ... بر اساس آزمون Duncan با یکدیگر در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.

جدول ۱: مقادیر MIC و MBC عصاره‌های C.cyanus(mg/ml)

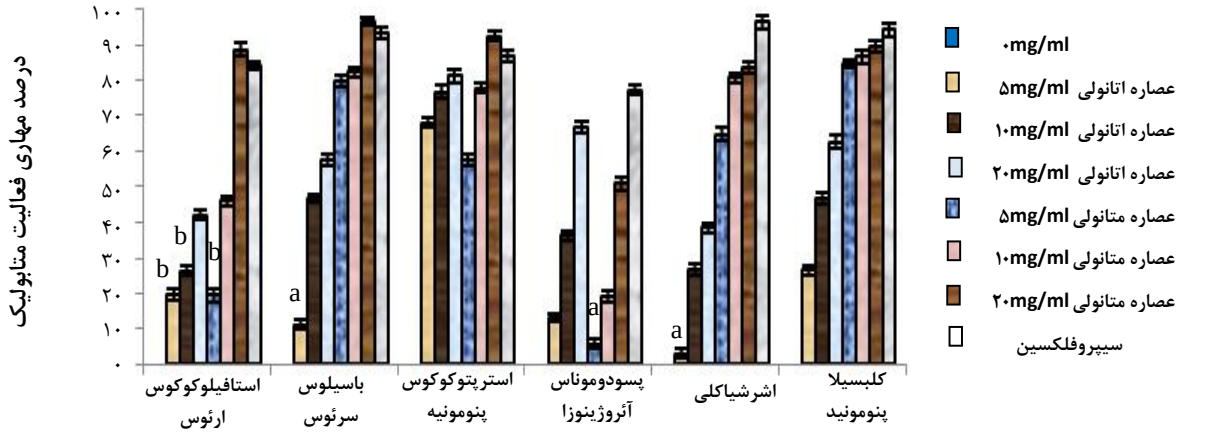
باکتری	MIC عصاره متانولی	MIC عصاره اتانولی	MBC عصاره متانولی	MBC عصاره اتانولی
استافیلوکوکوس ارئوس	۰/۳۹	۰/۳۹	۱/۵۶	۱/۵۶
باسیلوس سرئوس	۰/۷۸	۰/۳۹	۱/۵۶	۰/۷۸
استرپتوکوکوس پنومونیه	۳/۱۲	۱/۵۶	۶/۲۵	۳/۱۲
پسودوموناس آئروژینوزا	۱/۵۶	۰/۷۸	۳/۱۲	۱/۵۶
اشرشیا کلی	۰/۷۸	۰/۳۹	۳/۱۲	۰/۷۸
کلبسیلا پنومونیه	۱/۵۶	۰/۷۸	۶/۲۵	۳/۱۲

اثر مهاری غلظت‌های انتخابی عصاره‌های C. cyanus در مهار پدیده تشکیل بیوفیلم، تخریب ساختارهای بیوفیلمی و مهار فعالیت متابولیکی این ساختارها به ترتیب در نمودارهای ۲، ۳ و ۴ آمده است. بر اساس آزمون آنالیز واریانس داده‌های حاصل از آزمون‌های مذکور، خاصیت مهاری هر عصاره به نوع باکتری مورد سنجش، نوع حلال بکار رفته در عصاره‌گیری و غلظت عصاره وابسته بوده و تأثیر هر یک از این عوامل بر قابلیت مهاری عصاره در سطح ۱ درصد نیز اثر معنی‌دار می‌باشد ($p<۰/۰۱$). همچنین اثرات متقابل هر یک از عوامل مذکور نیز در سطح ۱ درصد معنی‌دار است ($p<۰/۰۱$)(جدول ۲).

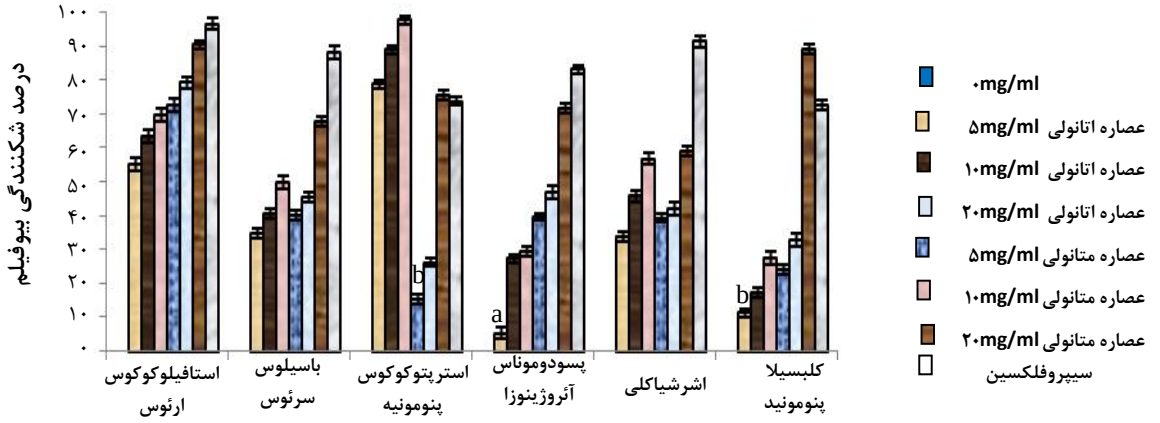
[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-11-26]



نمودار ۲. مقایسه اثر مهاری غلظت‌های متفاوت عصاره‌های الکلی گیاه گل‌گندم بر تشکیل بیوفیلم باکتری‌های انتخابی
a نشان‌دهنده عدم معنی‌دار بودن مهار غلظت مورد و b نشان‌دهنده مهار معنی‌دار غلظت مورد بررسی



نمودار ۳. مقایسه قابلیت غلظت‌های متفاوت عصاره‌های الکلی گیاه گل‌گندم در حذف ساختارهای بیوفیلمی باکتری‌های انتخابی
a نشان‌دهنده عدم معنی‌دار بودن مهار غلظت مورد و b نشان‌دهنده مهار معنی‌دار غلظت مورد بررسی



نمودار ۴. مقایسه اثر غلظت‌های متفاوت عصاره‌های الکلی گیاه گل‌گندم در مهار فعالیت متابولیک بیوفیلم باکتری‌های انتخابی
a نشان‌دهنده عدم معنی‌دار بودن مهار غلظت مورد و b نشان‌دهنده مهار معنی‌دار غلظت مورد بررسی

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-11-26]

جدول ۲: تحلیل آماری اثرگذاری پارامترهای مختلف آزمون‌های انجام شده بر ساختارهای بیوفیلمی

منابع تغییر	درجه آزادی (df)	میانگین مربعات (MS)		
		مهار تشکیل بیوفیلم	تخریب بیوفیلم	مهار آنزیم دهیدروژناز
طرح فاکتوریل اصلی	۴۷	۰/۳۷**	۰/۲۹**	۰/۴۷**
باکتری	۵	۰/۹۸**	۱/۷۸**	۱/۶۳**
عصاره	۱	۰/۱۱**	۰/۰۵**	۰/۴۴**
غلظت	۳	۲/۲۱**	۰/۹۷**	۳/۴۴**
باکتری * عصاره	۵	۰/۰۶**	۰/۰۶**	۰/۲۳**
باکتری * غلظت	۱۵	۰/۳۵**	۰/۱۰۲**	۰/۰۷**
عصاره * غلظت	۳	۰/۰۳**	۰/۰۰۷**	۰/۱۴**
باکتری * عصاره * غلظت	۱۵	۰/۰۱**	۰/۰۱**	۰/۰۴**
خطا	۹۶	۰/۰۰۲	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱
کل	۱۴۴			

** در سطح۵ درصد معنی‌دار، p<۰/۰۵

در مهار تشکیل بیوفیلم‌های باکتری‌های مورد بررسی، اثر مهاری انواع اتانولی عصاره‌های C. cyanus بیشتر از نوع متانولی آن بوده و این در حالی است که عصاره‌های متانولی در تخریب بیوفیلم‌ها و سرکوب فعالیت متابولیکی ساختارهای مذکور توانمندتر از عصاره‌های اتانولی بودند. البته لازم به ذکر است که عصاره‌های اتانولی در تخریب بیوفیلم‌های پسودوموناس آئروژینوزا و سرکوب فعالیت متابولیک سلول‌های بیوفیلم استرپتوکوکوس پنومونیه قابلیت بیشتری نسبت به عصاره‌های متانولی داشتند. بر اساس میانگین قابلیت غلظت‌های مختلف عصاره در هر یک از آزمون انجام شده بر ساختارهای بیوفیلمی، بیشترین مهار پدیده تشکیل بیوفیلم در باکتری‌های اشرشیاکلی (۸۴/۲۶٪) و استرپتوکوکوس پنومونیه (۸۳/۱۴٪) مشاهده شد. با این وجود عصاره متانولی گیاه گل‌گندم تنها در غلظت ۲۰ mg/ml به مهار تشکیل بیوفیلم پسودوموناس آئروژینوزا بوده و تشکیل بیوفیلم در این باکتری کمترین حساسیت (۱۸/۵۶٪) را به عصاره‌های C. cyanus نشان داد.

در تیمار با عصاره‌های گیاه گل‌گندم بیشترین تخریب ساختارهای بیوفیلمی در استرپتوکوکوس پنومونیه (۷۵/۶۶٪) و کمترین تخریب در پسودوموناس آئروژینوزا (۳۲/۰۹٪) مشاهده گردید. فعالیت متابولیکی بیوفیلم‌ها نیز در تیمار با عصاره‌های C. cyanus به حد قابل توجه‌ای کاهش یافت که بیشترین کاهش در استافیلوکوکوس ارئوس (۷۱/۸۵٪) و کمترین کاهش در باکتری‌های کلبسیلا پنومونیه (۳۳/۷۶٪) و پسودوموناس آئروژینوزا (۳۶/۸۷٪) را در این آزمون نشان دادند.

بحث و نتیجه‌گیری

بروز مقاومت‌های دارویی در میان باکتری‌های پاتوژن موجب شده تا روزانه افراد زیادی در سراسر جهان قربانی بیماری‌های عفونی گردند. مقاومت یک میکروارگانیسم به ترکیبات ضدمیکروبی به علل مختلف بروز می‌کند که جایگیری در ساختار یک بیوفیلم از دلایل مهم آن محسوب می‌شود(۲۱). بیوفیلم‌ها تجمعاتی از سلول‌های میکروبی در یک ماتریکس خودساخته بوده و بر سطوح مختلف تشکیل می‌شوند. با توجه به مشکلات ناشی از تشکیل بیوفیلم‌ها بر تجهیزات صنعتی و ابزارهای پزشکی ضرورت دستیابی به شیوه‌های نوین مقابله با ساختارهای مذکور ضروری است(۴،۷). امروزه توجه خاصی به ترکیبات زیستی در مقابله با میکروارگانیسم‌های مختلف به چشم می‌خورد که در این بین گیاهان دارویی جایگاه ویژه‌ای دارند. سابقه‌ی طولانی مصرف گیاهان دارویی در طب سنتی، مقبولیت عام و دسترسی ساده، همه از جمله دلایلی هستند که مشتقات گیاهی را به گزینه‌های بسیار مناسبی در مقابله با

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-11-26]

سویه‌های میکروبی مقاوم به دارو تبدیل می‌کنند(۲). از این جهت در پژوهش حاضر خواص ضدمیکروبی C. cyanus بر باکتری‌های انتخابی معین گردید.

در آزمون انتشار دیسک اگرچه دیسک‌های آغشته به عصاره‌های گیاه گل‌گندم در مقایسه با آنتی‌بیوتیک شاهد اثر مهاری کمتری بر باکتری‌های انتخابی نشان دادند اما قادر به مهار باکتری‌های استافیلوکوکوس ارئوس، باسیلوس سرئوس و اشرشیاکلی در سطح معنی‌داری ۱ درصد بودند($p<0/01$). از آنجا که عصاره‌های مذکور در محیط مایع آزمون MIC در غلظتی بسیار کمتر از غلظت بکار رفته در تهیه دیسک رشد باکتری‌های مورد بررسی را مهار نمودند می‌توان چنین نتیجه‌گیری نمود که عصاره‌های C. cyanus در محیط مایع بسیار کارآمدتر هستند. از این جهت چنین به نظر می‌رسد که عصاره‌های مذکور همانند بسیاری از عصاره‌های گیاهی دیگر قابلیت انتشاری اندکی در محیط جامد داشته و برای اثرگذاری مطلوب در این محیط به غلظتی بسیار بیشتر از غلظت موثر در محیط مایع نیازمندند.

در سایر پژوهش‌ها نیز خواص ضدمیکروبی گونه‌های مختلف گیاه گل‌گندم بر فرم منفرد باکتری‌ها تأیید شده است. برای مثال در مطالعه Stanojković و همکاران مشخص شده که عصاره‌های اتانولی و آبی گونه C. cyanus اثر مهاری مناسبی در آزمون انتشار دیسک بر استافیلوکوکوس ارئوس، اشرشیاکلی، باسیلوس سوبتیلیس و پسودوموناس آئروژینوزا نشان دادند. در این بررسی عصاره‌های اتانولی که با روش ماسراسیون به دست آمده بودند کارآمدتر از انواع آبی عصاره بودند که از راه جوشاندن تهیه شدند و با افزایش غلظت، اثر مهاری عصاره نیز افزایش نشان داده است(۲۲). در بررسی Warner و همکاران دیسک‌های تهیه شده از عصاره اتانولی C. cyanus به روش ماسراسیوندر غلظت ۱۰۰mg/ml تنها قادر به ایجاد هاله مهاری ضعیفی بر پروتئوس ولگاریس (7mm) بوده و هاله مهاری بر استافیلوکوکوس ارئوس، اشرشیاکلی، انتروکوکوس فکالیس و پسودوموناس آئروژینوزا نبوده است(۲۳). با توجه به تفاوت‌های موجود در فرآیند عصاره‌گیری در مطالعات ذکر شده و پژوهش حاضر می‌توان اختلافات مشاهده شده را توجیه نمود. در مطالعات ذکر شده عصاره‌گیری به روش ماسراسیون معمولی بوده و این در حالی است که در پژوهش حاضر پس از ماسراسیون، تغلیظ عصاره هم انجام شده است، طی این بررسی مشخص شد با تغلیظ عصاره، قابلیت مهاری آن به ویژه در آزمون انتشار دیسک افزایش می‌یابد. به علاوه گاهی زیرگونه‌های یک گیاه نیز حاوی ترکیبات نسبتا متفاوتی بوده و خواص متفاوتی را بروز می‌دهند. چنین تفاوتی در مطالعه بر برخی زیرگونه‌های دیگر گیاه گل‌گندم مشاهده شده است. برای مثال در بررسی Tekeli و همکاران مشخص شده که عصاره‌های متانولی حاصل از بخش‌های مختلف C.cankiriense که به روش ماسراسیون تهیه شده‌اند، اثر مهاری مناسبی بر فرم منفرد باکتری‌های استافیلوکوکوس ارئوس، باسیلوس سرئوس، اشرشیاکلی و سالمونلا انترتیدیس داشته و مقادیر MIC عصاره بر باکتری‌های مذکور mg/ml ۴-۱ می‌باشد(۱۰). در مطالعه Cansaran و همکاران که بر روی زیرگونه متفاوتی از همین گونه انجام شد، مشخص گردید که از بین حلال‌های مختلف بکار رفته در عصاره‌گیری این گیاه، اتیل استات و متانول موجب استخراج بیشترین ترکیبات مؤثره شده است و عصاره‌های حاصل از این دو حلال بیشترین اثر ضدمیکروبی را نشان می‌دهند. در این بررسی اثر عصاره‌های C.cankiriense بر پاتوژن‌هایی نظیر استافیلوکوکوس ارئوس، کلبسیلا پنومونیه، لیستریا مونوسیتوژنز و یرسینیا انتروکولیتیکا تأیید شده و بازه MIC به دست آمده µg/ml ۲۵۰-۷/۸ می‌باشد(۲۴).

قابلیت عصاره‌های گیاه گل‌گندم در مقابله با ساختارهای بیوفیلمی نیز طی این بررسی تأیید شده و مشخص شد که اثر مهاری هر عصاره به غلظت و نوع حلال آن و همچنین نوع باکتری مورد بررسی وابسته است. قابلیت عصاره‌های C. cyanus در مهار پدیده تشکیل بیوفیلم باکتری‌های استرپتوکوکوس پنومونیه، اشرشیاکلی و کلبسیلا پنومونیه بیشتر از قدرت تخریبی این ساختارها و یا مهار فعالیت متابولیکی آنها بود. در باکتری‌های استافیلوکوکوس ارئوس و پسودوموناس آئروژینوزا قابلیت عصاره‌های C. cyanus در سرکوب فعالیت متابولیکی

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-11-26]

بیوفیلم از قدرت مهار تشکیل بیوفیلم‌ها و همچنین تخریب این ساختارها بیشتر بود. در تیمار باکتری باسیلوس سرئوس عصاره‌های C.cyanus در تخریب ساختارهای بیوفیلمی توانمندتر از مهار پدیده تشکیل بیوفیلم و یا سرکوب فعالیت متابولیک آن بودند. از آنجا که مکانیسم‌های متفاوتی در تشکیل و گسترش ساختارهای بیوفیلمی هر یک از باکتری‌های مورد مطالعه دخیل است، مکانیسم‌های مهاری متفاوتی نیز از عصاره‌های C.cyanus برای هر باکتری انتظار می‌رود. به عنوان مثال عصاره‌های این گیاه ممکن است حاوی ترکیبات مؤثره‌ای باشند که به خوبی ساختارهای بیوفیلمی تثبیت شده را تخریب نماید اما اثر مهاری ضعیفی بر فرآیند تشکیل بیوفیلم داشته باشند. با توجه به اینکه ترکیبات موثره عصاره‌های الکلی C.cyanus و مکانیسم اثر مهاری آنها بر ساختارهای بیوفیلمی در این پژوهش مورد بررسی قرار نگرفت، می‌توان با شناسایی عناصر مذکور و با توجه به مولکول‌های کلیدی متفاوت که در فرآیند تشکیل بیوفیلم باکتری‌های مورد مطالعه دخیل هستند، اختلافات مشاهده شده را تحلیل نمود.

مطالعات انجام شده بر خواص ضدبیوفیلمی گیاه گل‌گندم بسیار محدود است. برای مثال در بررسی Damte و همکاران مشخص شد که عصاره‌های اتانولی C. cyanus که به روش ماسراسیون به دست آمده‌اند، قابلیت مناسبی در مهار پدیده کئوروم سنسینگ باکتری پسودوموناس آئروژینوزا سویه POA1 داشته اما بر مهار پدیده مذکور در سویه CV12472 کرموباکتریوم ویولاسئوم بی‌اثرند(۲۵). از آنجا که انجام کئوروم سنسینگ نقش بسیار مهمی در تشکیل و گسترش ساختارهای بیوفیلمی دارد، مهار پدیده مذکور در تیمار با عصاره‌های C. cyanus نشانگر قابلیت مناسب این عصاره‌ها در مهار ساختارهای بیوفیلمی است که این اثر در پژوهش جاضر نیز تأیید گردید.

لازم به ذکر است که دسترسی به نمونه‌های گیاهی مورد بررسی پژوهش حاضر محدود به فصل و مکان خاص بوده و از این جهت محدودیت‌هایی را در انجام این بررسی موجب گردید. بر اساس نتایج حاصل در این بررسی و سایر مطالعات انجام شده بر گونه‌های مختلف گیاه گل‌گندم، خواص ضدمیکروبی مشتقات مختلف این گیاه تأیید شده و این ترکیبات گزینه‌های مناسبی در مهار پاتوژن‌های مختلف می‌باشند. با توجه به اینکه عصاره‌های الکلی C.cyanus در این پژوهش اثر مهاری مناسبی بر فرم منفرد و بیوفیلمی باکتری‌های انتخابی نشان دادند، مطالعات بیشتر بر خواص ضدبیوفیلمی این گیاه به خصوص بر سویه‌های استاندارد میکروبی توصیه می‌شود. همچنین با تخلیص ترکیبات مؤثره عصاره‌های C.cyanus و بررسی میزان اثربخشی این عصاره‌ها در حیوانات آزمایشگاهی، می‌توان آنها را در مهار میکروارگانیسم‌های پاتوژن به ویژه در شکل بیوفیلمی به کار بست.

References:

1- Cowan MM. ***Plant products as antimicrobial agents.*** Cli Microbiol Rev 1999;12(4): 564-82.

2- Das K, Tiwari RKS, Shrivastava DK. ***Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends.*** J Med Plan Res 2010; 4(2): 104-11.

3- 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).*** Biol Pharm Bull 2007; 30(6): 1147-9.

4- Thomas JG, Posey SP. ***Emergence of oral/dental microbiology.*** Adv Adm Lab 2009; 18(6): 35-8.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-11-26]

5- Hoiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. ***Antibiotic resistance of bacterial biofilms.*** Int J Ant Age 2010; 35(4): 322-32.

6- Jefferson KK. ***What drives bacteria to produce a biofilm?.*** FEMS Mic 2004; 236(2): 163-70.

7- Myszka K, Czaczyk K. ***Bacterial biofilms on food contact surfaces – a review.*** Pol J Food Nut Sci 2011; 61(3): 173-80.

8- Ahi EA. ***Pharmacological plant biology.*** 1st ed. Mashhad: Mashhad University of Medical Sciences; Inc, 2012: 278-413. [Persian]

9- Kargıoglu M, CenkciS, SerteserA, Konuk M, Vural G. ***Traditional uses of wild plants in the middle Aegeanregion of Turkey.*** Hum Ecol 2010; 38(3): 429-50.

10- Yener T, Gokhan Z, Abdurrahman A, Mehmet S, Emrah T. ***Antibacterial activities of extracts from twelve Centaurea Species from Turkey.*** Arch Biol Sci 2011; 63(3): 685-90.

11- UgurA, Sarac N, Ceylan, Duru ME. ***Chemical composition of endemic Centaurea austro-anatolica and studies of its antimicrobial activity against multi-resistant bacteria.*** Acta Pharm J 2009; 59(4): 463-72.

12- Kuś PM, Jerković I, Tuberoso CI, Marijanović Z, Congiu F. ***Cornflower (Centaurea cyanus L.) honey quality parameters: chromatographic fingerprints, chemical biomarkers, antioxidant capacity and others.*** Food Chem 2014; 142(1): 12-8.

13- 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. St Louis: Mosby Co; 2013.p. 171-94.

14- Androw JM. ***Standardized disc susceptibility testing method.*** J Antimicrob Chem 2001; 25(1): 48-57.

15- Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Truck N. ***Antimicrobial susceptibility testing by a standardized single disk method.*** America J Clin Pathol 1996; 45(4): 493-6.

16- Vanden DA, Vlietinck AJ. ***Screening methods for anti bacterial and antiviral agents from higher plants.*** 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.

17- Cramton SE, Gerke C, Cotz F. ***In vitro methods to study biofilm formation.*** Meth Enzymol 2001; 336(1): 239-55.

18- Jabra-Rizk MA, Meiller TF, James CE, Shirtliff ME. ***Effect of farnesol on Staphylococcusaureus biofilm formation and antimicrobial susceptibility.*** J Antimicrob Agents 2006; 50(4): 1463-9.

19- Mahdavi M, Kasra Kermanshahi R, Jalali M. ***The assessment of disinfectants on various bacterial biofilms.*** Res J Univ Isf Sci 2006; 31(2): 35-46. [Persian]

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-11-26]

20- Nostro A, Bisignano G, Cannatelli MA, Crisafi G, Paola Germano M, Alonzo V. ***Effects of helichrysum italicum extract on growth and enzymatic activity of Staphylococcusaureus.*** Int J Antimicrob Agents 2001; 17(6): 517-20.

21- Tekwu EM, Pieme AC, Beng VP. ***Investigations of antimicrobial activity of some Cameroonian medicinal plant extracts against bacteria and yeast with gastrointestinal relevance.*** J Ethnopharmacol 2012; 142(1): 265-73.

22- Stanojković A, Ceković J, Čomić L, Pivić R, Stanojkovic A. ***Antibacterial properties of some plants from the family Astraceae growing wild in Serbia.*** Med 2005; 27(1): 41-4.

23- Warner AL, Hicks M, Bailey MA, Sung Hua M, Troyer TL, Huggins LG. ***The Isolation of potent cytotoxic natural products from centaurea cyanus.***West Virginia Wesleyan College, Buckhannon, University of Belize, Belmopan, 2009, Cited [12 Feb 2013] Available from: http://www.wvwc.edu/academics/dept/biology/pdf/ WVINBRECentaurea 2009.

24- Cansaran A, Mercan Dogan N, Öztekin M, Acar G. ***Antimicrobial activity of various extracts of centaurea cankiriense A. Duran and H. Duman.*** Afr JMic Res 2010; 4(8): 608-12.

25- Damte D, Gebru E, Lee SJ, Suh JW, Park SC. ***Evaluation of anti-quorum sensing activity of 97 indigenous plant extracts from korea through bioreporter bacterial strains chromobacterium violaceum and Pseudomonas aeruginosa.*** J Microb Biochem Technol 2013; 5(2): 42-6.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-11-26]

Investigating the Effectiveness of Centaureacyanus Extracts on Planktonic Growth and Biofilm Structures of Six Pathogenic Bacteria

Mohsenipour Z(MSc)[1], Hassanshahian M(PhD)[*2]

[1,2]Department of Biology, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

Received: 20 Jan 2014 ***Accepted:*** 14 Aug 2014

Abstract

Introduction: Nowadays, the treatments of infectious disease are regarded difficult due to increasing antibiotic resistance among pathogenic bacteria, which the reason may be placing of microorganisms in a structure named biofilm. Biofilms are complex structures consisting of surface-attached bacteria. Therefore, it is essential to find new compounds in order to remove and inhibit biofilms. This study aimed to examine the antibacterial activities of alcoholic extracts of Centaurea cyanus on the biofilm structures and planktonic form of six pathogen bacteria(Staphylococcusaureus, Bacilluscereus, Streptococcuspneumoniae, Pseudomonasaeruginosa, Escherichiacoli and Klebsiellapneumonia).

Methods: Antimicrobial activities of the alcoholic plant extracts against the planktonic form of bacteria were assessed via using the disc diffusion method. MIC and MBC values were determined by a macrobroth dilution technique and anti-biofilm effects were scrutinized by microtiter plate method.

Results: The results of this study confirmed high ability of C.cyanus extracts against the biofilm of the tested bacteria as well as their free-living forms. To inhibit bacterial growth, ethanolic extracts proved to be more effective than methanolic extracts. Anti-biofilm effects of plant extracts were associated with the solvent type and extract concentration. C.cyanus extracts were reported to be most efficient to inhibit biofilm formation of E. coli (84/26%) and S. pneumoniae(83/14%). The greatest eradication of biofilm structures were observed on S. pneumonia biofilm (75.66%), and the highest decrease in metabolic activity was reported in S.aureus biofilms (71/85%).

Conclusion: In this study the high capacity of C. cyanus extracts to encounter with whit biofilm was emphasized. Moreover, it was demonstrated that these extracts possess an appropriate potential to become active principles of new drugs.

Keywords: Antimicrobial Effect Biofilm; Centaurea Cyanus; Drug Resistant; Pathogen Bacteria

This paper should be cited as:
Mohsenipour Z, Hassanshahian M. ***Investigating the effectiveness of centaureacyanus extracts on planktonic growth and biofilm structures of six pathogenic bacteria***. J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2014; 22(4): 358-70.

Corresponding author: Tel: +989132906971, Fax: +983222032, Email: mshahi@uk.ac.ir

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-11-26]