DOI: 10.22122/jims.v36i482.9549 Published by Vesnu Publications

مجله دانشکده پزشکی اصفهان سال سی و ششم/شماره‌ی ۴۸۲/هفته‌ی دوم مرداد ۱۳۹۷

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۱/۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۲/۲۳ تاریخ چاپ: ۱۳۹۷/۵/۸

فعالیت ضد باکتریایی و ضد بیوفیلمی عصاره‌ی متانولی برگ، میوه و گال Pistacia Atlantica علیه چند نمونه باکتری بیماری‌زا

گلنار درخشنده قهفرخی[۱]، مریم محمدی سیچانی[۲]، مجید توکلی[۳]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: امروزه عفونت‌های باکتریایی و مقاومت آنتی‌بیوتیکی عوامل ایجاد کننده‌ی آن‌ها، از مهم‌ترین چالش‌های پیش روی محققان و پزشکان می‌باشند. در این پژوهش، خاصیت ضد باکتریایی و ضد بیوفیلمی عصاره‌ی متانولی برگ، میوه و گال Pistacia atlantica بر روی تعدادی از باکتری‌های بیماری‌زا مورد ارزیابی قرار گرفت.

روش‌ها: برگ، میوه و گال Pistacia atlantica از جنگل‌های استان لرستان جمع‌آوری شد. خاصیت ضد باکتریایی به روش انتشار چاهک بر Staphylococcus aureus، Bacillus cereus، Enterococcus faecalis، Pseudomonas aeruginosa و Escherichia coli مورد بررسی قرار گرفت. روش میکرودایلوشن (Microdilution) برای تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی و حداقل غلظت کشندگی استفاده شد. فعالیت ضد بیوفیلمی عصاره‌ی متانولی در غلظت‌های تحت کشنده بر روی تشکیل بیوفیلم Staphylococcus aureus و Pseudomonas aeruginosa به روش میکروتیتر پلیت بررسی شد.

یافته‌ها: عصاره‌های متانولی برگ، میوه و گال Pistacia atlantica اثرات ضدباکتریایی قابل توجهی علیه باکتری‌های مورد آزمایش به استثنای Escherichia coli داشتند. بین فعالیت ضد باکتریایی و غلظت عصاره‌ها ارتباط معنی‌داری وجود داشت ($P < ۰/۰۵۰$). عصاره‌ی متانولی گال، بالاترین اثر ضد باکتریایی را داشت. حداقل غلظت مهار کنندگی عصاره‌ی متانولی برگ، میوه و گال ۱۲/۵–۳ میلی‌گرم/میلی‌لیتر بود. حداقل غلظت کشندگی این عصاره، ۲۵–۶/۲۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر بود. عصاره‌ی متانولی گال Pistacia atlantica در غلظت ۶ میلی‌گرم/میلی‌لیتر به ترتیب باعث کاهش تولید بیوفیلم Staphylococcus aureus و Pseudomonas aeruginosa به میزان ۱۰۰ و ۷۴ درصد شد.

نتیجه‌گیری: عصاره‌ی متانولی بخش‌های مختلف گیاه Pistacia atlantica اثر ضد باکتریایی داشتند. همچنین، عصاره‌ی متانولی باعث کاهش تولید بیوفیلم Staphylococcus aureus و Pseudomonas aeruginosa شد.

واژگان کلیدی: عصاره‌ی گیاهی، Pistacia، مواد ضد باکتریایی، بیوفیلم

ارجاع: درخشنده قهفرخی گلنار، محمدی سیچانی مریم، توکلی مجید. **فعالیت ضد باکتریایی و ضد بیوفیلمی عصاره‌ی متانولی برگ، میوه و گال Pistacia Atlantica علیه چند نمونه باکتری بیماری‌زا.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۷؛ ۳۶ (۴۸۲): ۶۰۰–۵۹۴

مقدمه

استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها برای مهار و کنترل عفونت‌ها بسیار معمول می‌باشد و کاربرد وسیع آنتی‌بیوتیک‌ها، باعث گسترش سویه‌های مقاوم میکروبی شده است. برآورد شده است که بیش از ۸۰ درصد موارد عفونت‌های انسانی به تشکیل بیوفیلم باکتری مهاجم مربوط است (۱). بیوفیلم باکتریایی در بروز عفونت‌های مزمن انسانی، پلاک دندان، عفونت اجسام خارجی مانند کاتترها، بیماری‌های دامی، گیاهی و همچنین، در واحدهای فراوری مواد غذایی دخالت دارد (۳–۲). از این رو، امروزه استفاده از توان بالقوه‌ی مواد مؤثره‌ی گیاهی برای درمان بیماری‌ها و عفونت‌های میکروبی مورد توجه قرارگرفته است. علاوه بر ویژگی‌های ضد میکروبی، ترکیبات گیاهی دارای خواص تغذیه‌ای و آنتی‌اکسیدانی می‌باشند که می‌تواند در رژیم غذایی مورد توجه قرار گیرد (۵–۴).

دامنه‌های رشته کوه زاگرس یکی از مناطق اصلی رویش گیاهان

۱- گروه میکروبیولوژی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران

۲- استادیار، گروه میکروبیولوژی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران

۳- استادیار، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی لرستان، خرم‌آباد، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: مریم محمدی سیچانی

Email: mohamadi_m@iaufala.ac.ir

وحشی محسوب می‌شوند. Pistacia که در ایران به نام بنه یا پسته‌ی کوهی شناخته می‌شود، درختی به ارتفاع ۷-۲ متر است که در مناطق سرد و معتدل می‌روید (۶). Pistacia atlantica دارای برگ‌های مرکب، تک شانه‌ای است که برای درمان فشار خون، سرفه، گلودرد، اگزما و درد معده به کار می‌رود. ترکیبات موجود در برگ، بازدارنده‌ی تکثیر و عامل القای مرگ سلول‌های سرطانی روده‌ی بزرگ انسان می‌باشد. میوه‌ی Pistacia atlantica به شکل دانه‌های عدس است و اسیدهای چرب تشکیل دهنده‌ی آن اولئیک اسید، لینولئیک اسید، آلفالینولئیک اسید، پالمتیک اسید، پالمتیولیک اسید هستند.

همچنین، ترکیبات فنلی در میوه شناسایی شده‌اند. گال ایجاد شده بر روی درخت پسته‌ی کوهی توسط شته‌ی Slavum wertheimae ایجاد می‌شود. این حشرات، با گوناگونی و تنوع قابل توجه ریخت‌شناسی بر روی میزبان‌های خود گال کیسه‌ای، تاج‌خروسی، گل‌کلمی و نخودی تولید می‌کنند (۷). اگر چه مکانیسم مولکولی روند ایجاد گال هنوز ناشناخته باقی مانده است، اما مطالعات زیست‌محیطی متعدد و آنالیزهای فیلوژنتیکی ثابت کرده است که حشرات، کنترل کننده‌ی رفتار گال‌ها هستند و در حقیقت، آن‌ها را برای بهره‌مندی خودشان ایجاد می‌کنند (۸).

روش‌ها

جمع‌آوری گیاه و گال: برگ، میوه و گال Pistacia atlantica از جنگل‌های استان لرستان جمع‌آوری شد و توسط متخصصین مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی مورد تأیید قرار گرفتند. هر یک از محصولات در سایه خشک شد و به شکل پودر آماده گردید.

روش عصاره‌گیری: برای تهیه‌ی عصاره‌ی متانولی نمونه‌های گیاهی از روش خیساندن استفاده شد. مقدار ۱۰ گرم از پودر برگ، میوه و گال به سه ارلن حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر متانول ۸۵ درصد اضافه شد و به مدت ۷۲ ساعت بر روی Shaker ۱۲۰ دور در دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت و سپس، محتویات ارلن صاف شد و تحت شرایط استریل خشک گردید. پودر عصاره تا زمان انجام آزمایش در شیشه‌های تیره در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری گردید (۹).

تهیه‌ی سویه‌های میکروبی استاندارد: فعالیت ضد باکتریایی عصاره‌ها بر روی سویه‌های Staphylococcus aureus (ATCC: 6538)، Bacillus cereus (ATCC: 11778)، Enterococcus faecalis (ATCC: 29212)، Escherichia coli (ATCC: 25922) و Pseudomonas aeruginosa (ATCC: 9027) مورد بررسی قرار گرفت.

میکروارگانیسم‌های مورد آزمایش به صورت لیوفیلیزه از کلکسیون میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه گردیدند. نمونه‌های میکروبی مطابق با روش‌های استاندارد احیا شدند. سوسپانسیون میکروبی از کشت تازه و جوان مطابق با کدورت لوله‌ی استاندارد McFarland ۰/۵ تهیه شد و به نسبت ۰/۱ برای رسیدن به غلظت $۱/۵ \times ۱۰^{۷}$ باکتری در هر میلی‌لیتر رقیق شد (۱۰).

فعالیت ضد باکتریایی عصاره به روش انتشار در آگار: به منظور بررسی اثرات ضد باکتریایی عصاره‌ها، غلظت ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳ و ۱ میلی‌گرم/میلی‌لیتر از عصاره‌ی متانولی تهیه گردید. فعالیت ضد باکتریایی به روش انتشار چاهک با ایجاد چاهک‌هایی به قطر ۶ میلی‌متر بر روی محیط کشت Muller-Hinton agar مورد بررسی قرار گرفت. از آنتی‌بیوتیک ایمی‌پنم با غلظت ۱۰ میکروگرم/میلی‌لیتر به عنوان شاهد استفاده گردید (۱۱-۱۰). حداقل غلظت مهار کنندگی (Minimum inhibitory concentration یا MIC) و حداقل غلظت کشندگی (Minimum bactericidal concentration یا MBC) به روش میکرودایلوشن (Microdilution) در میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای استریل انجام شد (۱۱). به منظور تأیید نتایج، آزمایش‌ها ۳ بار تکرار گردید. تجزیه و تحلیل داده‌ها با آزمون ANOVA و با استفاده از نرم‌افزار SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL) انجام شد.

بررسی فعالیت ضدبیوفیلمی عصاره‌ی متانولی گیاه Pistacia atlantica: فعالیت ضد بیوفیلمی عصاره‌ها به روش میکروتیترپلیت در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای ته صاف مخصوص کشت بافت به روش رنگ‌آمیزی با کریستال ویوله انجام شد. کشت تازه‌ی Staphylococcus aureus و Pseudomonas aeruginosa با کدورت معادل لوله‌ی استاندارد McFarland ۰/۵ در محیط کشت Muller-Hinton broth حاوی ۱ درصد گلوکز تهیه شد. سری چاهک A به عنوان شاهد منفی در نظر گرفته شد. این چاهک، تنها حاوی ۳۰۰ میکرولیتر محیط کشت ۱ درصد گلوکز بود. چاهک B به عنوان شاهد مثبت حاوی ۱۵۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری و ۱۵۰ میکرولیتر محیط کشت ۱ درصد گلوکز بود. سایر چاهک‌ها با غلظت‌های مختلف از عصاره‌ی متانولی برگ، میوه، گال و سوسپانسیون باکتری تلقیح شدند. میکروپلیت‌ها، به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از ۷۲ ساعت، محتویات چاهک‌ها تخلیه شد سپس، ۱۵۰ میکرولیتر اتانول به مدت ۱۵ دقیقه جهت تثبیت ساختارهای بیوفیلمی به هر چاهک افزوده گردید. پس از آسپیره کردن اتانول، به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر کریستال ویوله‌ی ۲ درصد به منظور رنگ‌آمیزی بیوفیلم اضافه شد. بعد از ۵ دقیقه، محتویات خالی شد و در زیر جریان آب غیر مستقیم شسته شد. در ادامه، ۲۰۰ میکرولیتر اسید استیک گلایسیال ۳۳ درصد به هر چاهک اضافه شد و میکروپلیت‌ها ۲۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد. در انتها، جذب چاهک‌ها در

دستگاه خوانش Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) در طول موج ۴۹۲ نانومتر خوانده شد. میزان درصد کاهش بیوفیلم از طریق فرمول زیر محاسبه گردید (۱۳-۱۲).

$$\text{درصد کاهش بیوفیلم} = \frac{(C-B)-(T-B)}{(C-B)}$$

در فرمول پیش‌گفته، C میانگین جذب چاهک‌های شاهد مثبت، B میانگین جذب چاهک‌های شاهد منفی و T میانگین جذب چاهک‌های آزمون است. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS انجام شد. برای مقایسه‌ی مقادیر هاله‌ی عدم رشد در سه بار تکرار بین گروه‌ها، از آزمون Kruskal-Wallis استفاده شد. همچنین، آزمون تعقیبی Mann-Whitney با تعدیل Boneferroni برای انجام مقایسه‌های دوتایی استفاده شد. برای تمام آزمون‌ها $P < ۰/۰۵۰$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

میانگین قطر هاله‌ی عدم رشد حاصل از تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره‌های برگ، میوه و گال Pistacia atlantica در جدول ۱ آمده است.

غلظت‌های مربوط به حداقل غلظت مهار کنندگی و حداقل غلظت کشندگی عصاره‌ها در جدول۲ آمده است.

ارزیابی فعالیت ضد بیوفیلمی عصاره‌ی متانولی برگ، میوه و گال Pistacia atlantica در غلظت‌های کمتر از غلظت کشندگی نشان داد که عصاره‌ی متانولی برگ و میوه در غلظت ۶ میلی‌گرم/میلی‌لیتر تولید بیوفیلم Staphylococcus aureus را به طور کامل مهار نموده است. با کاهش غلظت عصاره‌ی متانولی به ۱/۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر، کارایی ضد بیوفیلمی عصاره کاهش می‌یابد. همچنین، عصاره‌ی متانولی برگ در غلظت ۶ میلی‌گرم/میلی‌لیتر تا ۱۰۰ درصد مانع از تشکیل بیوفیلم Pseudomonas aeruginosa شد (شکل ۱).

بر اساس یافته‌های به دست آمده و طبق نتیجه‌ی آزمون Kruskall-Wallis در غلظت‌های ۱۰۰-۶/۲۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر در عصاره‌ی متانولی برگ، تفاوت معنی‌داری بین قطر هاله‌ی عدم رشد ۵ باکتری مشاهده شد ($P < ۰/۰۵۰$).

جدول ۱. میانگین قطر هاله‌ی عدم رشد باکتری‌ها در غلظت‌های مختلف عصاره‌ی متانولی میوه، برگ و گال Pistacia atlantica (بر حسب میلی‌متر)

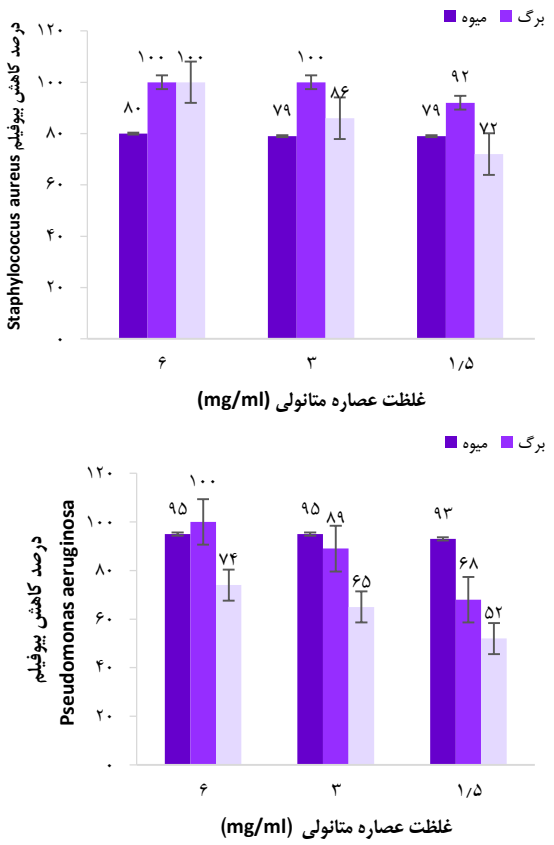
عصاره‌ی متانولی	غلظت (میلی‌گرم/میلی‌لیتر)	Pseudomonas aeruginosa	Escherichia coli	Enterococcus faecalis	Staphylococcus aureus	Bacillus cereus	مقدار P
		میانگین ± انحراف معیار	میانگین ± انحراف معیار	میانگین ± انحراف معیار	میانگین ± انحراف معیار	میانگین ± انحراف معیار	
میوه	۱۰۰	۱۸/۶۷ ± ۰/۵۸	۱۰/۰۰ ± ۰/۰۰	۲۲/۰۰ ± ۱/۰۰	۲۲/۳۳ ± ۲/۰۸	۲۱/۳۳ ± ۱/۱۵	۰/۰۲۳
	۵۰	۱۵/۶۷ ± ۱/۱۵	-	۱۹/۰۰ ± ۱/۰۰	۱۹/۳۳ ± ۱/۱۵	۱۹/۰۰ ± ۱/۷۳	۰/۰۲۵
	۲۵	۱۳/۰۰ ± ۱/۰۰	-	۱۵/۶۷ ± ۰/۵۸	۱۷/۳۳ ± ۲/۰۸	۱۷/۳۳ ± ۱/۱۵	۰/۰۱۹
	۱۲/۵	۱۰/۶۷ ± ۰/۵۸	-	۱۴/۶۷ ± ۱/۵۳	۱۵/۰۰ ± ۲/۶۵	۱۵/۰۰ ± ۰/۰۰	۰/۰۲۴
	۶/۲۵	۶/۶۷ ± ۱/۱۵	-	۹/۶۷ ± ۰/۵۸	۱۰/۰۰ ± ۱/۰۰	۱۰/۶۷ ± ۱/۱۵	۰/۰۲۱
	۳	-	-	-	۷/۳۳ ± ۱/۱۵	۸/۳۳ ± ۰/۵۸	۰/۰۲۳
	۱	-	-	-	-	-	۱/۰۰۰
برگ	۱۰۰	۱۴/۰۰ ± ۱/۰۰	۱۰/۶۷ ± ۰/۵۸	۱۵/۶۷ ± ۰/۵۸	۱۷/۳۳ ± ۰/۵۸	۱۸/۰۰ ± ۱/۰۰	۰/۰۱۱
	۵۰	۱۱/۶۷ ± ۱/۵۳	۸/۰۰ ± ۰/۰۰	۱۴/۳۳ ± ۰/۰۵	۱۴/۶۷ ± ۰/۵۸	۱۶/۳۳ ± ۰/۵۸	۰/۰۱۰
	۲۵	۱۱/۳۳ ± ۱/۱۵	-	۱۱/۶۷ ± ۱/۱۵	۱۴/۰۰ ± ۰/۰۰	۱۵/۰۰ ± ۱/۰۰	۰/۰۱۲
	۱۲/۵	۹/۶۷ ± ۱/۵۳	-	۱۰/۰۰ ± ۱/۰۰	۱۱/۳۳ ± ۱/۱۵	۱۳/۳۳ ± ۱/۵۳	۰/۰۲۰
	۶/۲۵	۸/۰۰ ± ۰/۰۰	-	-	۷/۳۳ ± ۱/۱۵	۹/۶۷ ± ۰/۵۸	۰/۰۱۴
	۳	-	-	-	-	-	۰/۹۹۹ <
	۱	-	-	-	-	-	۰/۹۹۹ <
گال	۱۰۰	۲۲/۳۳ ± ۲/۵۲	۱۲/۳۳ ± ۰/۵۸	۲۰/۳۳ ± ۰/۵۸	۲۳/۰۰ ± ۱/۰۰	۲۳/۳۳ ± ۰/۵۸	۰/۰۳۶
	۵۰	۱۹/۰۰ ± ۱/۰۰	۹/۶۷ ± ۰/۵۸	۱۹/۶۷ ± ۰/۵۸	۱۹/۰۰ ± ۱/۰۰	۲۲/۳۳ ± /۵۸	۰/۰۴۰
	۲۵	۱۴/۳۳ ± ۱/۱۵	۸/۶۷ ± ۱/۱۵	۱۵/۳۳ ± ۰/۵۸	۱۶/۰۰ ± ۱/۰۰	۱۶/۶۷ ± ۰/۵۸	۰/۰۲۲
	۱۲/۵	۱۰/۳۳ ± ۰/۵۸	-	۱۴/۶۷ ± ۱/۵۳	۱۲/۶۷ ± ۱/۱۵	۱۳/۶۷ ± ۱/۵۳	۰/۰۱۷
	۶/۲۵	۷/۳۳ ± ۱/۱۵	-	۱۳/۰۰ ± ۰/۰۰	۱۱/۰۰ ± ۱/۰۰	۱۲/۰۰ ± ۱/۷۳	۰/۰۱۴
	۳	-	-	۱۱/۳۳ ± ۰/۵۸	۹/۶۷ ± ۰/۵۸	۹/۶۷ ± ۰/۵۸	۰/۰۱۰
	۱	-	-	۱۰/۰۰ ± ۰/۰۰	۸/۰۰ ± ۰/۰۰	۷/۳۳ ± ۱/۱۵	۰/۰۱۳
ایمی‌پنم	۱۰ میکروگرم/میلی‌لیتر	-	۲۵/۰۰ ± ۰/۰۰	۱۸/۶۷ ± ۰/۴۷	۳۵/۰۰ ± ۰/۰۰	۲۹/۰۰ ± ۰/۰۰	۰/۰۰۸

جدول ۲. مقادیر حداقل غلظت مهار کنندگی و حداقل غلظت کشندگی عصاره‌ی متانولی **Pistacia atlantica**

عصاره‌ی متانولی			Bacillus cereus	Staphylococcus aureus	Enterococcus faecalis	Escherichia coli	Pseudomonas aeruginosa
برگ	MIC		۶/۲۵	۱۲/۵	۶/۲۵	۱۰۰	۱۲/۵
	MBC		۱۲/۵	۲۵	۱۲/۵	۲۰۰	۲۵
میوه	MIC		۶/۲۵	۱۲/۵	۱۲/۵	۵۰	۱۲/۵
	MBC		۱۲/۵	۲۵	۲۵	۱۰۰	۲۵
گال	MIC		۳	۶/۲۵	۳	۵۰	۱۲/۵
	MBC		۶/۲۵	۱۲/۵	۶/۲۵	۱۰۰	۲۵

MIC: Minimum inhibitory concentration; MBC: Minimum bactericidal concentration

همچنین، در غلظت‌های ۱۰۰–۳ میلی‌گرم/میلی‌لیتر عصاره‌ی متانولی میوه، تفاوت معنی‌داری بین قطر هاله‌ی عدم رشد همه‌ی باکتری‌های منتخب مشاهده گردید ($P < ۰/۰۵۰$). همچنین، قطر هاله‌ی عدم رشد عصاره‌ی متانولی گال در غلظت ۱۰۰–۱ میلی‌گرم/میلی‌لیتر بین ۵ باکتری تفاوت معنی‌داری داشت ($P < ۰/۰۵۰$)؛ به عبارت دیگر، قطر هاله‌ی عدم رشد ناشی از فعالیت ضد باکتریایی عصاره‌های متانولی برگ، میوه و گال Pistacia atlantica با توجه به گونه‌ی باکتری مورد آزمایش متفاوت بود.



شکل ۱. اثر عصاره‌ی متانولی بخش‌های مختلف **Pistacia atlantica** بر کاهش بیوفیلم **Staphylococcus aureus** و **Pseudomonas aeruginosa**

بحث

عصاره‌های گیاهی از زمان‌های قدیم برای درمان بیماری‌ها مورد استفاده قرار گرفته‌اند. با توجه به ویژگی زیست‌سازگاری این مواد و اثرات دارویی مفید آن‌ها، تحقیق بر روی اثرات ضد باکتریایی گیاهانی که مصرف آن‌ها در طب سنتی برای درمان بیماری‌ها گزارش شده است، از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد (۱۴). در این پژوهش، نشان داده شد که عصاره‌های متانولی برگ، میوه و گال Pistacia atlantica اثرات ضد باکتریایی به نسبت بالایی بر روی باکتری‌های مورد آزمایش به ویژه بر روی انواع گرم مثبت داشتند. در روش انتشار چاهک اندازه‌ی قطر هاله‌ی عدم رشد با مقدار غلظت عصاره‌ها رابطه‌ی مستقیمی داشت. روند اثرگذاری بر روی باکتری‌های منتخب مورد مطالعه، نشان دهنده‌ی آن است که عصاره‌ی متانولی این گیاه، اثر ضد باکتریایی مشخصی دارد که با افزایش غلظت یا به عبارت دیگر با افزایش ماده‌ی مؤثره، این اثر نیز بیشتر می‌شود. در بین باکتری‌های گرم مثبت مورد بررسی، Bacillus cereus در عصاره‌ی متانولی برگ و گال و Staphylococcus aureus در عصاره‌ی متانولی میوه با داشتن قطر هاله‌ی عدم رشد بزرگ‌تر در غلظت‌های مختلف از عصاره‌ها نسبت به اثر عصاره‌ی متانولی حساس‌تر بودند. باکتری گرم منفی Pseudomonas aeruginosa با قطر هاله‌ی عدم رشد بزرگ‌تر و میزان MIC کوچک‌تر در عصاره‌ی متانولی گال نسبت به باکتری Escherichia coli حساس‌تر بود.

در پژوهش صورت گرفته توسط Edrah و همکاران، اثر ضد باکتریایی عصاره‌ی اتانولی برگ Pistacia atlantica بر روی دو سویه‌ی باکتری گرم مثبت، Staphylococcus epidermidis و Staphylococcus saprophyticus و باکتری گرم منفی Escherichia coli بررسی شد. در روش دیسک دیفیوژن، Escherichia coli و Staphylococcus epidermidis نسبت به عصاره مقاوم بودند. قطر هاله‌ی عدم رشد برای Staphylococcus saprophyticus در غلظت ۵۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر ۸ میلی‌متر بود (۱۵)، اما در بررسی حاضر نیز عصاره‌ی متانولی برگ

بر روی باکتری Escherichia coli اثر مهاری نداشت.

در مطالعه‌ی مرتضوی و همکاران بر روی فعالیت ضد باکتریایی هسته‌ی میوه‌ی Pistacia khinjuk علیه Staphylococcus aureus و Escherichia coli، مشخص شد حساسیت عصاره‌ی اتانولی هسته‌ی میوه‌ی پسته‌ی وحشی بر روی Escherichia coli بیشتر است. مقادیر MIC در محدوده‌ی ۲۰-۱۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر گزارش شد (۱۶). انتخاب روش و حلال مناسب بر روی فعالیت بیولوژیک عصاره‌ها تأثیرگذار است. عصاره‌های گیاهان، به طور معمول در حلال‌های آلی نظیر اتانول، متانول، استون و هگزان بهتر حل می‌شوند (۱۷).

یکی از نکات جالب در این پژوهش، فعالیت ضد باکتریایی عصاره‌های متانولی میوه و گال Pistacia atlantica بر روی Pseudomonas aeruginosa بود؛ در حالی که این باکتری، نسبت به آنتی‌بیوتیک ایمی‌پنم مقاوم بود. طبق یافته‌های به دست آمده، قطر هاله‌ی عدم رشد Pseudomonas aeruginosa در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر در عصاره‌ی متانولی میوه و گال به ترتیب ۱۸/۶۷ و ۲۲/۳۳ میلی‌متر به دست آمد. فعالیت ضد باکتریایی عصاره‌ی متانولی میوه و گال Pistacia atlantica نسبت به فعالیت ضد باکتریایی آنتی‌بیوتیک ایمی‌پنم بر روی باکتری Enterococcus faecalis بیشتر بود. با افزایش غلظت هر کدام از عصاره‌ها، هاله‌ی بازدارندگی به طور معنی‌داری افزایش یافت. در مطالعه‌ی حاضر، مشخص شد با افزایش غلظت هر کدام از عصاره‌ها، هاله‌ی بازدارندگی به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که عصاره‌ی میوه و گال Pistacia atlantica با دارا بودن مقادیر بالای مواد مؤثره‌ی گیاهی بر روی باکتری‌های گرم مثبت، اثر مهاری بالایی دارند.

روزگار و همکاران، طی مطالعه‌ای گزارش نمودند که حداقل غلظت مهار کننده و حداقل غلظت کشنده‌ی عصاره‌ی آبی برگ Pistacia atlantica بر روی Streptococcus mutans ۶۰ و ۹۰ میکروگرم/میلی‌لیتر و برای Streptococcus mitis ۷۵ و ۱۱۰ میکروگرم/میلی‌لیتر بود (۱۸).

در مطالعه‌ی چهارمیری و همکاران، میانگین قطر هاله‌ی عدم رشد عصاره‌ی استونی و متانولی گال قلقاف بلوط بر روی Pseudomonas aeruginosa در غلظت ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به ترتیب ۲۷ و ۲۴ میلی‌متر گزارش شد و MIC عصاره‌ی استونی و متانولی گال قلقاف ۰/۲۵۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اعلام شد. با توجه به نتایج مطالعات ایشان و یافته‌های مطالعه‌ی حاضر، عصاره‌ی گال بلوط فعالیت ضد باکتریایی بالاتری نسبت به گال Pistacia atlantica دارد (۱۹).

در مورد اثرات ضد بیوفیلمی عصاره‌ی برگ، میوه و گال Pistacia atlantica پژوهشی در دسترس نبود. در مطالعه‌ی حاضر، آزمون درصد کاهش بیوفیلم Staphylococcus aureus و Pseudomonas aeruginosa به طور مشابهی در هر سه عصاره با افزایش غلظت عصاره‌ها رابطه‌ی مستقیمی داشت؛ به گونه‌ای که تشکیل بیوفیلم مطابق با شکل ۱، در غلظت‌های بالاتر از ۳ میلی‌گرم/میلی‌لیتر در عصاره‌ی متانولی بیش از ۹۰ درصد کاهش می‌یابد. در مطالعه‌ای، تأثیر عصاره‌های متانولی جفت بلوط، برگ پسته‌ی وحشی و برگ سنجد علیه سویه‌های استاندارد Pseudomonas aeruginosa بررسی و مشخص شد که این عصاره‌ها، قابلیت مهار کنندگی و کشندگی خوبی علیه این باکتری دارند. عصاره‌ی متانولی بلوط، پسته‌ی وحشی و سنجد، به ترتیب ۶۰/۲۴، ۵۷/۳۵ و ۷۲/۶۳ درصد تشکیل بیوفیلم Pseudomonas aeruginosa را مهار کرد. طبق این یافته‌ها، مشخص شد عصاره‌ی متانولی سنجد نسبت به دو عصاره‌ی دیگر، توانایی بالاتری در مهار بیوفیلم دارد (۲۰). همچنین، اثر مهاری عصاره‌ی اتانولی، متانولی و استونی بلوط بر روی بیوفیلم Streptococcus mutans مشخص کرد غلظت‌های کمتر از ۱۹/۵ میکروگرم/میلی‌لیتر از هر سه نوع عصاره‌ی آزمایش شده، کمتر از ۵۰ درصد در حذف بیوفیلم تأثیر داشتند؛ اما با افزایش غلظت عصاره‌ها از ۱۹/۵ تا ۳۱۲/۵ میکروگرم/میلی‌لیتر، بیوفیلم Streptococcus mutans حذف گردید. در غلظت ۳۱۲/۵ میکروگرم/میلی‌لیتر از عصاره‌ی استونی و اتانولی گال بلوط، بیوفیلم Streptococcus mutans ۱۰۰ درصد حذف شد (۲۱).

در مطالعه‌ی امیدی و شریفی، حداقل غلظت مهار کنندگی عصاره‌ی متانولی برگ پسته‌ی وحشی علیه Pseudomonas aeruginosa ۲/۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر بود. همچنین، این عصاره به میزان ۳۵/۵۷ درصد از تشکیل بیوفیلم Pseudomonas aeruginosa جلوگیری کرد (۲۰). با مقایسه‌ی نتایج مطالعه‌ی پیش‌گفته (۲۰) و یافته‌های مطالعه‌ی حاضر، می‌توان نتیجه گرفت که عصاره‌های Pistacia atlantica تأثیر زیادی در مهار بیوفیلم باکتری‌ها دارند که این مسأله، به احتمال زیاد به دلیل ترکیبات فعال خاصی است که در عصاره‌های استخراج شده وجود دارد. عصاره‌ی متانولی گال Pistacia atlantica نسبت به عصاره‌ی گیاهان پیش‌گفته، اثر مهاری بیشتری بر Staphylococcus aureus و Pseudomonas aeruginosa داشت که می‌تواند نشان دهنده‌ی این مطلب باشد که مواد مؤثره‌ی موجود در گال، ماهیت‌های شیمیایی مختلفی دارد که به واسطه‌ی حلال‌های گوناگون قابل جداسازی می‌باشد.

با توجه به یافته‌های به دست آمده از مطالعه‌ی حاضر، عصاره‌ی متانولی برگ، میوه و گال دارای فعالیت ضد باکتریایی است. از این رو، بررسی‌های فارموکولوژیک بر روی این عصاره‌ها ضروری است.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد به شماره‌ی ۱۷۲۳۰۵۰۷۹۴۲۰۰۶ است که در دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان به انجام رسید. بدین وسیله از کارشناسان محترم آزمایشگاه تحقیقاتی این دانشگاه قدردانی می‌گردد.

References

1. Shokri D, Rabbani-Khorasgani M. New molecular resistance mechanisms against antibiotics in bacteria. J Isfahan Med Sch 2015; 33(328): 410-28. [In Persian].
2. Taj Y, Essa F, Aziz F, Kazmi SU. Study on biofilm-forming properties of clinical isolates of Staphylococcus aureus. J Infect Dev Ctries 2012; 6(5): 403-9.
3. Wu H, Moser C, Wang HZ, Hoiby N, Song ZJ. Strategies for combating bacterial biofilm infections. Int J Oral Sci 2015; 7(1): 1-7.
4. Solanki R. Some medicinal plants with antibacterial activity. Pharmacie Globale 2010; 1(4): 1-4.
5. Aliasghari A, Rabbani M, Khoroushi M, Emami H. In-vitro effect of alcoholic extract of Rosa damascene extract on cariogenic streptococci. J Isfahan Med Sch 2015; 33(327): 326-35. [In Persian].
6. Mahdavi A. The economic, social, and ecological impacts of wild pistachio (Pistacia atlantica Desf.) oleo-gum resin extraction cooperatives in Zagros forests, Ilam province, Iran. Forests, Trees and Livelihoods 2015; 24(4): 275-84.
7. Taheri Abkenar K, Salehi A, Bagheri J, Ravanbakhsh H. Some ecological properties of Pistacia atlantica Desf. in Khojir National Park, Iran. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology 2013; 19(3): 415-20.
8. Martinez J-JI. Impact of a gall-inducing aphid on Pistacia atlantica Desf. trees. Arthropod Plant Interact 2008; 2(3): 147-51.
9. Azmir J, Zaidul ISM, Rahman MM, Sharif KM, Mohamed A, Sahena F, et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. J Food Eng 2013; 117(4): 426-36.
10. Wiegand I, Hilpert K, Hancock RE. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. Nat Protoc 2008; 3(2): 163-75.
11. Balouiri M, Sadiki M, Ibnsouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. J Pharm Anal 2016; 6(2): 71-9.
12. Pompilio A, Pomponio S, Di V, V, Crocetta V, Nicoletti M, Piovano M, et al. Antimicrobial and antibiofilm activity of secondary metabolites of lichens against methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains from cystic fibrosis patients. Future Microbiol 2013; 8(2): 281-92.
13. Pitts B, Hamilton MA, Zelver N, Stewart PS. A microtiter-plate screening method for biofilm disinfection and removal. J Microbiol Methods 2003; 54(2): 269-76.
14. Karakas FP, Yildirim A, Turker A. Biological screening of various medicinal plant extracts for antibacterial and antitumor activities. Turk J Biol 2012; 36(6): 641-52.
15. Edrah S, Alafid F, Kumar A. Preliminary Phytochemical Screening and Antibacterial Activity of Pistacia atlantica and Prunus persica Plants of Libyan Origin. International Journal of Science and Research 2013; 4(2): 1552-5.
16. Mortazavi SH, Azadmard Damirchi S, Sowti M, Mahmudi R, Safaeean F, Moradi Azad S. Antimicrobial effects of ethanolic extract of the hull and the core of Pistacia Khinjuk stocks. Innovative Food Technologies 2014; 1(4): 81-8. [In Persian].
17. Mudzengi CP, Murwira A, Tivapasi M, Murungweni C, Burumu JV, Halimani T. Antibacterial activity of aqueous and methanol extracts of selected species used in livestock health management. Pharm Biol 2017; 55(1): 1054-60.
18. Roozegar MA, Azizi JF, Reza HM, Panahi J, Pakzad I. Antimicrobial effect of Pistacia atlantica leaf extract. Bioinformation 2016; 12(1): 19-21.
19. Chaharmiri Dokhaharani S, Karbasizadeh V, Mohammadi-Sichani M, Tavakoli M. Antibacterial activity of aqueous extracts of Mazuj and Ghalghaf galls of Quercus infectoria in Lorestan forests . Yafte 2013; 15(2): 43-51. [In Persian].
20. Omidi A, Sharifi A. The effect of methanolic extracts of plants quercus brantii, pistacia atlantica and elaeagnus angustifolia on biofilm formation of Pseudomonas aeruginosa. Armaghane-danesh 2017; 21(10): 999-1012. [In Persian].
21. Mohammadi-Sichani M, Karbasizadeh V, Dokhaharani SC. Evaluation of biofilm removal activity of Quercus infectoria galls against Streptococcus mutans. Dent Res J (Isfahan) 2016; 13(1): 46-51.

DOI: *10.22122/jims.v36i482.9549* *Published by Vesnu Publications*

Journal of Isfahan Medical School **Vol. 36, No. 482, 2nd Week, August 2018**

Received: 27.01.2018 Accepted: 13.05.2018 Published: 30.07.2018

Antibiofilm and Antibacterial Activity of Pistacia Atlantica against some Pathogenic Bacteria

Golnar Darakhshandeh-Ghahferokhi[1], Maryam Mohammadi-Sichani[2], Majid Tavakoli[3]

Original Article

Abstract

Background: Bacterial infections and the antibiotic resistance of pathogens are the most important challenges faced by researchers and physicians. In this study, the antibacterial and antibiofilm properties of methanol extracts of leaf, fruit, and gall of Pistacia atlantica were evaluated against some of pathogenic bacteria.

Methods: Leaf, fruit, and gall of Pistacia atlantica were collected from forests of Lorestan Province, Iran. Antibacterial properties were investigated against Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Enterococcus faecalis, Pseudomonas aeruginosa, and Escherichia coli through the well diffusion method. The microdilution method was used to determine the minimum inhibitory concentration and the minimum bactericidal concentration. The antibiofilm activity of methanol extract was studied in the sub-lethal concentrations on biofilm formation of Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa using microtiter plate method.

Findings: The methanol extracts of leaf, fruit, and gall of Pistacia atlantica had significant antibacterial effects against the tested bacteria except Escherichia coli. There was a significant relationship between the antibacterial activity and the extract concentration ($P < 0.05$). The highest antibacterial effect was observed in the gall methanol extract. The minimum inhibitory concentration and the minimum bactericidal concentration of the methanol extract of leaf, fruit, and gall was 3.0-12.5 and 6.25-25.00 mg/ml, respectively. The methanol extract of Pistacia atlantica gall at a concentration of 6 mg/ml reduced the biofilm production of Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa by 100% and 74%, respectively.

Conclusion: The methanol extracts of different parts of Pistacia atlantica had antibacterial effects. In addition, the methanol extract reduced biofilm production of Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa.

Keywords: Plant extracts, Pistacia, Antibacterial agents, Biofilm

Citation: Darakhshandeh-Ghahferokhi G, Mohammadi-Sichani M, Tavakoli M. **Antibiofilm and Antibacterial Activity of Pistacia Atlantica against some Pathogenic Bacteria.** J Isfahan Med Sch 2018; 36(482): 594-600.

1- Department of Microbiology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran
2- Assistant Professor, Department of Microbiology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran
3- Assistant Professor, Agricultural and Natural Resources Research Center of Lorestan, Khorramabad, Iran
Corresponding Author: Maryam Mohammadi-Sichani, Email: mohamadi_m@iaufala.ac.ir