

مرضیه آقائی علی آبادی^۱، لیلا اسدپور^۲

بررسی اثر سینرژیسیم سیپروفلوکساسین و عصاره موروس نیگرا در مهار رشد و تشکیل بیوفیلم جدایه های سودوموناس آئروژینوزا

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۹/۱ : تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۶/۲

چکیده

زمینه و هدف: سودوموناس آئروژینوزا یک باکتری گرم منفی و یکی از مهم ترین پاتوژن های فرصت طلب ایجاد کننده عفونت های بیمارستانی است که معمولاً به طور همزمان مقاومت چند دارویی کسب می کند. این مطالعه با هدف بررسی اثر هم افزایی سیپروفلوکساسین و عصاره موروس نیگرا در مهار رشد و تشکیل بیوفیلم سودوموناس آئروژینوزا انجام شد.

مواد و روش ها: این مطالعه بر روی ۱۰ جدایه سودوموناس آئروژینوزا با مقاومت چندگانه آنتی بیوتیکی انجام شد. از روش دیسک دیفیوژن برای تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی سویه ها استفاده گردید. برای بررسی برهم کنش های ضد میکروبی بین عصاره موروس نیگرا با آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین از روش تیتراسیون چکربورد و محاسبه شاخص غلظت های ممانعت کننده سهمی (FICI) استفاده شد. تاثیر عصاره موروس نیگرا، آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین و ترکیب این دو بر بیان ژن *pslA* به روش ریل تایم PCR بررسی شد.

یافته ها: عصاره موروس نیگرا به تنهایی اثر ضد میکروبی علیه سویه های پاتوژن سودوموناس نشان داد. استفاده از این عصاره در ترکیب با آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین بر مهار رشد جدایه های سودوموناس آئروژینوزا اثر افزایشی داشت و سبب کاهش بیش از ۶۰ درصدی تشکیل بیوفیلم جدایه ها گردید ($P<0.05$). همچنین عصاره موروس نیگرا به تنهایی و در ترکیب با آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین به طور معنی داری سبب کاهش بیان ژن *pslA* گردید.

نتیجه گیری: نتایج حاضر در خصوص امکان استفاده از عصاره موروس نیگرا در افزایش اثر آنتی بیوتیک امیدوار کننده است. ممکن است استفاده از این عصاره با و یا به جای آنتی بیوتیک ها راهی برای کاهش استفاده از داروهای آنتی بیوتیک موجود باشد و بدین ترتیب عوارض جانبی و هزینه های درمانی بیماری های عفونی را کاهش دهد.

واژه های کلیدی: عصاره گیاهی، موروس نیگرا، سینرژیسیم، بیوفیلم، سودوموناس آئروژینوزا

نویسنده مسئول:

^۲دانشیار، گروه زیست شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

۰۹۱۱۳۳۸۳۸۶۰

l.asadpour@yahoo.com

مقدمه

سودوموناس آئروژینوزا یک باسیل گرم منفی غیر تخمیری و یکی از میکروارگانیسم های اصلی عامل عفونت های فرصت طلب و بیمارستانی است. این باکتری مسئول طیف گسترده ای از عفونت های حاد و مزمن شامل عفونت های تنفسی، ادراری، عفونت زخم و سوختگی ها و سپتی سمی هاست. درمان عفونت های ناشی از سودوموناس آئروژینوزا اغلب پیچیده است زیرا این ارگانیسم نسبت به بسیاری از آنتی بیوتیک ها مقاومت ذاتی داشته به راحتی می تواند در برابر اغلب آنتی بیوتیک های موثر مقاومت کسب نماید به گونه ای که در بسیاری از مطالعات سویه های مقاوم به چند داروی این باکتری گزارش شده است. این امر در درمان عفونت های ناشی از این باکتری چالش آفرین بوده و اغلب منجر به عوارض و مرگ و میر قابل توجهی می شود.^۱ سودوموناس آئروژینوزا دارای تعداد زیادی از فاکتورهای حدت مانند قابلیت تولید بیوفیلم، تولید اگزوتوکسین A، اگزوتوکسین S، الاستاز و سیالیداز است که به شدت توسط سیستم های سیگنالینگ سلول به سلول تنظیم می شوند. بیوفیلم ها جمعیتی از میکروارگانیسم ها هستند که توسط ماتریکس پلی ساکارید خارج سلولی خود محصور شده اند. بیوفیلم ها به عنوان موانع کارآمد در برابر عوامل ضد میکروبی عمل می کنند علت آن تراکم بالای سلول های باکتری در این ساختار و ممانعت از عدم ورود آنتی بیوتیک به مرکز بیوفیلم و همچنین بیرون راندن آنتی بیوتیک ها از بیوفیلم است. سودوموناس آئروژینوزا یکی از مهمترین باکتری های مولد بیوفیلم است. این باکتری می تواند در سطوح مختلف مثل بافت های زنده، دستگاه های پزشکی و ایمپلنت ها بیوفیلم ایجاد کند. تشکیل بیوفیلم توسط سودوموناس آئروژینوزا طی چندین مرحله از جمله اتصال به سطح توسط تاژک ها و پروتئین های سطحی و به دنبال آن تقسیم سلولی برای تشکیل میکروکلونی و در نهایت بلوغ بیوفیلم انجام می گیرد که این مرحله همراه با بیان پلیمرهای ماتریکس است. همچنین تولید این بیوفیلم ها به ترکیبات رشد، PH و دیگر فاکتور های بیولوژیکی بستگی دارد^{۲-۴}.

گسترش مقاومت های آنتی بیوتیکی سبب شده است که داروهای ضد میکروبی موجود تاثیر کمتر داشته یا حتی ناکارآمد شوند. در سال های اخیر استراتژی های مختلفی برای غلبه بر مقاومت به

آنتی بیوتیک ها پیشنهاد شده است. یکی از راهکارهای پیشنهادی برای دستیابی به این هدف، استفاده از عصاره گیاهان و یا ترکیبات موجود در گیاهان می باشد. همچنین یکی از راهکارها ترکیب سایر مولکول ها با آنتی بیوتیک هایی است که باکتری ها نسبت به آن ها مقاومت پیدا کرده اند، این عمل ظاهراً فعالیت ضد باکتریایی مطلوب را بازیابی می کند. این مولکول ها می توانند داروهای غیر آنتی بیوتیکی با خواص ضد باکتری بالقوه باشند که می توانند فرصتی برای رویکردهای درمانی نوآورانه ایجاد کنند و فواید مختلفی از جمله افزایش بهره وری، کاهش دوز موثر و کاهش عوارض نامطلوب داروها را در پی داشته باشند^{۵،۶}. طی ۱۰ سال گذشته، اثربخشی ترکیبات گیاهان در ترکیب با آنتی بیوتیک در مطالعات مختلف به اثبات رسیده است. همچنین ترکیبات فعال مانند عصاره های گیاهی بعنوان منابع مهم تخریب کننده بیوفیلم ها شناخته شده اند. داروهای گیاهی و مشتقات آن ها نه تنها نقش موثری در درمان بیماری های مبتنی بر بیوفیلم دارند بلکه در مقایسه با داروهای شیمیایی عوارض جانبی کمتری نیز دارند^۲. مهار تشکیل بیوفیلم را می توان با حضور ترکیباتی همچون فلاونوئیدها، کورستین، کامفرول، نارینگین و اپیزین که قابلیت کاهش سنتز بیوفیلم را به وسیله سرکوب فعالیت سیستم کروم سنسینگ برای ارتباط سلول با سلول دارند، توضیح داد. این ترکیبات، بیان ژن های دخیل با تشکیل بیوفیلم باکتریایی را، سرکوب می کنند^{۴،۷}. از جمله گیاهانی که بررسی خواص ضد میکروبی آن مورد توجه قرار گرفته است موریس نیگرا از میوه های تیره توت است که منبع بی نظیری از ترکیبات فیتوشیمیایی و فنلی هستند. میوه های موریس نیگرا اسیدی و کاملاً تیره رنگ هستند و دارای مقادیر زیاد آنتوسیانین است که نقش مهمی در صنایع دارویی و غذایی دارد^۸. هدف از مطالعه حاضر، بررسی اثر هم افزایی سیپروفلوکساسین و عصاره موریس نیگرا در مهار رشد و تشکیل بیوفیلم جدایه های سودوموناس آئروژینوزا می باشد.

مواد و روش ها

جمع آوری نمونه، جداسازی و شناسایی باکتری

جدایه های بالینی سودوموناس آئروژینوزا از نمونه های سوختگی در استان گیلان جمع آوری گشته و به آزمایشگاه منتقل گردید. جهت تایید تشخیص و خالص سازی باکتریها تست های

بیوشیمیایی مختلف شامل بررسی قابلیت تولید همولیزین، اکسیداز، کاتالاز، اوره آز، قابلیت رشد در دمای ۴۲ درجه سانتیگراد، منظره رشد در محیط های مک کانکی، TSI و SIM آگار مولر هیتون انجام شد. همچنین مرفولوژی کلنی و باکتری ها و نوع رنگ پذیری در رنگ آمیزی گرم بررسی گردید و تأیید شدند.

آزمون تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی جدایه های سودوموناس آئروژینوزا

تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا توسط تست آنتی بیوگرام (دیسک دیفیوژن) و مطابق استاندارد CLSI انجام شد. دیسک های آنتی بیوتیک مورد استفاده شامل آمیکاسین، جنتامایسین، سفنازیدیم، سفوتاگسیم، سفتریاکسون، سفکستین، ایمینیم، مروپنم، پپراسیلین، اریترومایسین، آزیترومایسین، کوتریموکسازول، سیپروفلوکساسین، انروفلوکساسین و کلیستین بود. سپس جدایه هایی که به بیش از دو کلاس آنتی بیوتیکی مقاوم بودند به عنوان سویه های با مقاومت آنتی بیوتیکی چند گانه تعیین گردید.

ارزیابی فنوتیپی قابلیت تولید بیوفیلم جدایه ها به روش میکروپلیت

برای بررسی قدرت تشکیل بیوفیلم ابتدا از جدایه ها کشت در محیط تریپتیکاز سوی براث (مرک، آلمان) حاوی ۱ درصد گلوکز سوسپانسیونی معادل نیم مک فارلند تهیه شد. سپس به هر چاهک الیزا ۲۰۰ میکرولیتر از این کشت اضافه شد و میکروپلیت در انکوباتور ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. پس از انکوبه شدن، چاهک ها سه بار با PBS شستشو شدند تا باکتری هایی که نجسبیده اند جدا شوند. در مرحله بعد، سایر باکتری هایی که به چاهک چسبیده اند با استفاده از ۲۵۰ میکرولیتر اتانول ۹۶ درصد به مدت ۱۵ دقیقه فیکس شدند. بعد از آن هر چاهک با ۲۰۰ میکرولیتر کریستال ویوله ۰/۲ درصد رنگ آمیزی شد و بعد از ۵ دقیقه رنگ با آب مقطر شستشو داده شد. بعد از خشک شدن پلیت ها، آنالیز کمی بیوفیلم با اضافه کردن ۲۰۰ میکرولیتر از گلاسیال استیک اسید ۳۳ درصد به هر چاهک و خواندن OD آنها در طول موج ۴۹۲ نانومتر توسط دستگاه الیزا ریدر محاسبه شد. در ارزیابی بیوفیلم تشکیل شده براساس میزان

جذب نوری، سویه ها بعنوان تولید کننده قوی بیوفیلم ($OD > 1.500$)، تولید کننده بیوفیلم ($0.500 < OD < 1.500$) و بیوفیلم منفی ($OD < 0.500$) در نظر گرفته شدند^۳.

بررسی اثر مهارى عصاره موروس نیگرا بر جدایه های بالینی سودوموناس آئروژینوزا به روش انتشار از دیسک

به منظور بررسی اثر ضد میکروبی عصاره حاصل بر جدایه های بالینی سودوموناس آئروژینوزا، از روش انتشار از دیسک استفاده شد. برای این منظور ابتدا محیط کشت مولر هیتون آگار آماده شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی با کدروت ۰/۵ مک فارلند به صورت چمنی و پر روی محیط مولر هیتون آگار کشت شد. بعد از کشت دیسک های آغشته به ۵۰۰ میکروگرم عصاره (خشک شده) تحت شرایط استریل با استفاده از پنس استریل به کشت منتقل شد. بعد از قرار دادن دیسک ها در پلیت بسته و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد گرماخانه نگهداری شد. بعد از ۲۴ ساعت پلیت را بررسی و با استفاده از خط کش قطر هاله عدم رشد اندازه گیری گردید. این آزمایش در ۳ تکرار انجام شد.

تعیین MIC سیپروفلوکساسین و عصاره موروس نیگرا به روش براث میکرودايلوشن

کم ترین غلظت مهارکننده رشد آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین به روش براث میکرودايلوشن انجام شد. جهت انجام این آزمایش از آنتی بیوتیک و عصاره به صورت جداگانه سری رقت های متوالی در محیط کشت مولر هیتون براث تهیه شد. سپس از ۱۰ جدایه بالینی منتخب سودوموناس آئروژینوزا که دارای مقاومت چندگانه آنتی بیوتیکی بودند کشت تازه با کدورتی معادل با استاندارد نیم مک فارلند تهیه شد و رقت یک دهم از آن تهیه گردید. سپس از سوسپانسیون میکروبی حاصل، ۱۰۰ میکرولیتر به هر چاهک اضافه شد. سپس پلیت ها به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. این آزمایش در ۲ تکرار انجام شد.

نتیجه بر اساس پنج اثر مختلف بصورت اثر هم افزایی کامل (FIC ≤ 0.5)، اثر هم افزایی نسبی ($0.5 \leq FIC \leq 0.75$)، اثر افزایشی ($0.75 \leq FIC \leq 1.0$)، اثر بی تفاوت ($1.0 \leq FIC \leq 2.0$)، آنتاگونیستی ($FIC \geq 2.0$) بدست آمد.^۸

بررسی اثر سیپروفلوکساسین و عصاره موروس نیگرا بر مهار بیوفیلم سودوموناس آئروژینوزا

اثرات کمی ضدبیوفیلمی به روش میکروپلیت ۹۶ خانه بررسی شد. روش کار همانند ارزیابی فنوتیپی قابلیت تولید بیوفیلم بود با این تفاوت که محیط تریپتیکاز سوی براث حاوی غلظت تحت MIC عصاره موروس نیگرا و سیپروفلوکساسین و غلظت تحت FIC ترکیب این دو بود. چاهک های حاوی محیط به تنهایی، آنتی بیوتیک به تنهایی و عصاره موروس نیگرا به تنهایی بعنوان کنترل در نظر گرفته شدند. سنجش کمی بیوفیلم پس از انکوباسیون به صورت درصد تعیین شد. میزان جذب نوری چاهک های فاقد آنتی بیوتیک یا عصاره (محیط به تنهایی) بعنوان ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شد. این آزمایش در ۳ تکرار انجام شد.

بررسی حضور ژن های *psIA* در جدایه های مولد بیوفیلم سودوموناس آئروژینوزا

به منظور بررسی حضور ژن *psIA* در جدایه های مولد بیوفیلم سودوموناس آئروژینوزا، DNA ژنومی جدایه های منتخب سودوموناس آئروژینوزا به روش جوشاندن استخراج شد. و به عنوان الگو در واکنش PCR با استفاده از پرایمر اختصاصی این ژن ها مورد استفاده قرار گرفت. محصول PCR بر روی ژل آگارز الکتروفورز و صحت انجام واکنش مورد بررسی قرار گرفت.^۹

بررسی اثر هم افزایی آنتی بیوتیک و عصاره بر روی سویه های سودوموناس آئروژینوزا به روش چک لیست صفحه ای در یک میکروپلیت ۹۶ خانه رقت های متوالی از سیپروفلو-کساسین در امتداد محور X و عصاره موروس نیگرا در امتداد محور Y در محیط آبگوشت مولر-هیتون ریخته شدند (۱۰۰ میکرولیتر در هر چاهک). به این ترتیب در یک صفحه شطرنجی، هر چاهک حاوی ترکیب منحصر به فردی از دو ترکیب مورد آزمایش بود. سپس از ۱۰ جدایه بالینی منتخب سودوموناس آئروژینوزا که دارای مقاومت چندگانه آنتی بیوتیکی بودند کشت تازه با کدورتی معادل با استاندارد نیم مک فارلند تهیه شد و رقت یک دهم از آن تهیه گردید. سپس از سوسپانسیون میکروبی حاصل، ۱۰۰ میکرولیتر به هر یک از چاهک ها اضافه شد. دو ستون هم به کنترل های مثبت و منفی اختصاص داده شد. سپس میکروپلیت ها به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در انکوباتور قرار داده شد و در نهایت رشد باکتری در چاهک به روش چشمی و خواندن جذب نوری کشت ها با استفاده از الیزا ریدر در طول موج ۶۳۰ بررسی شد. این آزمایش در ۲ تکرار انجام شد.

محاسبه غلظت مهار کسری

هم افزایی با استفاده از شاخص غلظت مهار کسری (FIC) با استفاده از روش سنجش چک لیست صفحه ای تعیین شد. این شاخص با استفاده از حداقل غلظت های مهار (MIC) ترکیبات ضد میکروبی و MIC مربوطه هنگام ترکیب شدن آن ها با هم محاسبه می شود. فرمول محاسبه FIC بصورت زیر است:

$$FIC = MIC(A \text{ in the presence of } B) / MIC(A \text{ alone}) + MIC(B \text{ in the presence of } A) / MIC(B \text{ alone})$$

جدول ۱- نام و توالی نوکلئوتیدی پرایمرهای مورد استفاده در انجام مطالعه

منبع	طول (جفت باز)	توالی نوکلئوتیدی پرایمر (۵'-۳')	نام ژن
۱۰	198	TCCCTACCTCAGCAGCAAGCTGGT (F) CGGATGTCGTGGTTGCGTACCAGGTAT (R)	<i>psIA</i>
۱۰	231	GCAACTATCAACCAGCTGGTG (F) GCTGTGCTCTTGCAAGTTGTG (R)	<i>rpsL</i> (reference)

بررسی اثر سیپروفلوکساسین و عصاره موروس نیگرا بر بیان

ژن *pslA*

استخراج RNA و سنتز cDNA

از جدایه های سودوموناس آئروژینوزای تیمار شده با غلظت SubMIC و عصاره موروس نیگرا، سیپروفلوکساسین و Sub FBIC ترکیب این دو استخراج RNA با استفاده از کیت شرکت سیناژن انجام گردید. همچنین از کشت باکتری بدون حضور مواد ضد میکروبی به عنوان کنترل استفاده شد. بلافاصله از RNA استخراج شده برای ساخت cDNA با استفاده از کیت شرکت سیناژن استفاده شد. بدین ترتیب که میکروگرم از RNA استخراج شده همراه با ۱ میکرولیتر پرایمر رندوم هگزامر با اضافه کردن آب DEPC treated در میکروتیوپ عاری از نوکلئاز به حجم ۱۰ میکرولیتر رسانده شد و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد و پس از آن ۲ دقیقه بر روی یخ قرار داده شد. سپس مخلوط به آرامی spin شد و ۱۰ میکرولیتر cDNA synthesis mix به آن اضافه شد. پس از مخلوط کردن اجزای واکنش، میکروتیوپ بمدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵ و سپس ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتیگراد قرار داده شد. در نهایت با قرار دادن میکروتیوپ در دمای ۸۵ درجه سانتیگراد بمدت ۵ دقیقه، واکنش متوقف گردید. صحت انجام واکنش سنتز cDNA از طریق انجام الکتروفورز روی ژل آگارز تایید گردید. سپس cDNA سنتز شده به عنوان الگو در واکنش Real time-PCR مورد استفاده قرار گرفت. در این بررسی از ژن *pslA* به عنوان ژن استاندارد استفاده شد. پرایمر اختصاصی ژن های مورد بررسی با توالی گزارش شده توسط Oliveira و همکاران (۲۰۲۰) به صورت لیوفلیزه از شرکت متابیون (آلمان) تهیه گردید. توالی نوکلئوتیدی پرایمرهای مورد استفاده در جدول آمده است و واکنش زنجیرهای پلیمرز در حجم ۲۰ میکرولیتر با استفاده از کیت شرکت Genet bio CAT.NO:Q ۹۲۱۰ کره جنوبی به صورت زیر انجام شد:

۱۰ میکرولیتر از mix (2x) with syber green qmaster، پرایمر های پیشرو و پیرو (۱۰ میکرومول) ۱ میکرولیتر، cDNA الگو (۱ میکروگرم) ۱ میکرولیتر، آب مقطر ۷ میکرولیتر انجام گرفت. برنامه حرارتی ترموسایکلر به ترتیب شامل مراحل واسرشته شدن اولیه در ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، ۳۵ سیکل حرارتی ۹۵ درجه سانتیگراد ۳۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتیگراد ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتیگراد ۳۰ ثانیه بود. تغییر بیان ژن از طریق $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه شد. این آزمایش در ۲ تکرار انجام شد.

یافته ها

باکتری مورد مطالعه

در این تحقیق ۱۰ جدایه بالینی سودوموناس آئروژینوزا در استان گیلان با الگوی مقاومت چندگانه آنتی بیوتیکی و مولد بیوفیلم مورد مطالعه قرار گرفت. از این تعداد ۵ جدایه بیوفیلم قوی تولید کردند.

نتایج بررسی MIC سیپروفلوکساسین

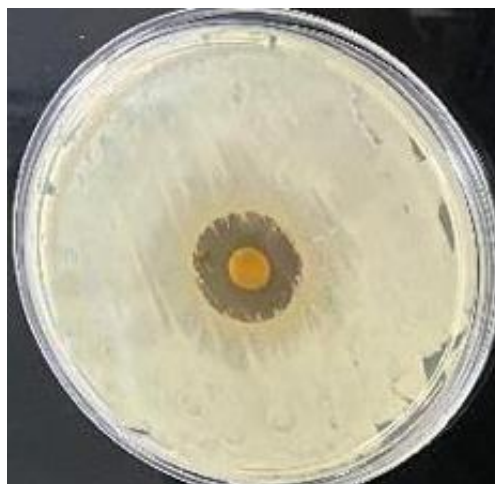
میزان MIC سیپروفلوکساسین در جدایه های مقاوم به روش براث میکرودايلوشن بررسی شد و مقدار آن در ۲ جدایه ۶۴ میکروگرم بر میلی لیتر، در ۳ جدایه ۱۲۸ میکروگرم بر میلی لیتر و در ۴ جدایه ۲۵۶ میکروگرم بر میلی لیتر، ۱۰ جدایه ۵۱۲ میکروگرم بر میلی لیتر بود.

نتایج بررسی اثر مهاري عصاره موروس نیگرا بر جدایه های

بالینی سودوموناس آئروژینوزا

اثر عصاره موروس نیگرا بر مهار رشد جدایه های سودوموناس آئروژینوزا به روش انتشار از دیسک و تعیین MIC بررسی شد. قطر هاله ممانعت از رشد ایجاد شده توسط ۵۰۰ میکروگرم عصاره موروس نیگرا در جدایه های مورد بررسی بین ۲۲-۱۴ میلیمتر متغیر بود. کم ترین غلظت مهار کننده ر شد (MIC) عصاره نیز در جدایه های مورد بررسی بین ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تا ۲۰۰۰

میکروگرم بر میلی لیتر متغیر بود. MIC عصاره موریس نیگرا در ۱۰ جدایه مقاوم به روش براث میکرودايلو شن بررسی شد و مقدار آن در ۳ جدایه ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر و در ۳ جدایه ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر و در ۴ جدایه ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر بود.



شکل ۱-- قطر هاله عدم رشد ایجاد شده توسط غلظت ۵۰۰ میکروگرم از عصاره به روش انتشار از دیسک

صفحه ای بررسی شد. از ۱۰ جدایه مورد بررسی در ۶ جدایه عصاره موریس نیگرا و آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین اثر هم افزایی نسبی و در ۴ جدایه اثر افزایشی بر هم داشتند.

نتایج اثر ترکیب سیپروفلوکساسین و عصاره موریس نیگرا بر مهار رشد جدایه های سودوموناس آئروژینوزا
FIC ترکیب غلظت های مختلف آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین و عصاره موریس نیگرا در ۱۰ جدایه مقاوم با روش چک لیست

جدول ۲- نتایج بررسی اثر ضد میکروبی ترکیب آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین و عصاره موریس نیگرا بر جدایه های MDR سودوموناس آئروژینوزا (برمبنای FIC)

باکتری	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
MIC سیپروفلوکساسین (µg/ml)	۶۲/۵	۶۲/۵	۱۲۵	۱۲۵	۱۲۵	۲۵۰	۵۰۰	۵۰۰	۵۰۰	۵۰۰
MIC عصاره	۵۰۰	۵۰۰	۵۰۰	۱۰۰۰	۵۰۰	۱۰۰۰	۱۰۰۰	۲۰۰۰	۲۰۰۰	۲۰۰۰
MIC سیپروفلوکساسین در ترکیب با عصاره	۳۱/۲	۱۶/۱	۳۱/۲	۶۲/۵	۳۱/۲	۱۲۵	۱۲۵	۲۵۰	۲۵۰	۱۲۵
MIC عصاره در ترکیب با سیپروفلوکساسین	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۵۰۰	۲۵۰	۲۵۰	۵۰۰	۵۰۰	۱۰۰۰	۱۰۰۰
FIC	۱	۰/۷۵	۰/۷۵	۱	۰/۷۵	۰/۷۵	۰/۷۵	۱	۱	۰/۷۵

نتایج بررسی اثر ترکیب سیپروفلوکساسین و عصاره موروس

نیگرا بر مهار بیوفیلم جدایه های سودوموناس آئروژینوزا

عصاره موروس نیگرا، سیپروفلوکساسین و ترکیب این دو سبب مهار بیوفیلم سودوموناس آئروژینوزا در مقایسه با شاهد گردید

($P < 0.05$). استفاده از عصاره در ترکیب با آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین سبب کاهش بیش از ۶۰ درصدی تشکیل بیوفیلم جدایه ها در مقایسه با شاهد گردید. درصد تشکیل بیوفیلم هر یک از تیمارها در جدول ۳ نشان داده شده است. حروف متفاوت در هر ستون نشانه معنی دار بودن اختلاف است ($P < 0.05$).

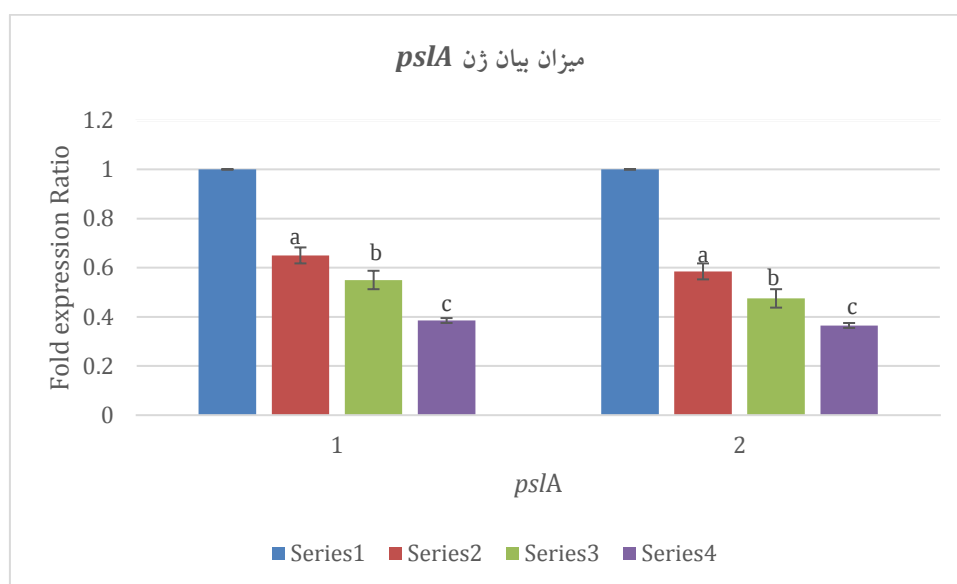
جدول ۳- نتایج بررسی اثر ضد بیوفیلمی آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین و عصاره موروس نیگرا بر جدایه های MDR سودوموناس آئروژینوزا (درصد تشکیل بیوفیلم در مقایسه با شاهد)

شماره باکتری	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
درصد مهار بیوفیلم تحت تیمار با عصاره	$58 \pm 4/5$	$55/5 \pm 0/4$	$56/5 \pm 4/8$	$51/5 \pm 2/4$	$55 \pm 3/5$	$53 \pm 2/5$	$60 \pm 4/0$	$59/5 \pm 2/7$	$55/5 \pm 5/2$	$58 \pm 3/5$
درصد مهار بیوفیلم تحت تیمار با سیپروفلوکساسین	$53 \pm 2/3$	$45 \pm 2/8$	$45/5 \pm 1$	$46/5 \pm 2$	55 ± 2	$49/5 \pm 3/2$	51 ± 3	$62 \pm 1/2$	$47/5 \pm 2$	$51/5 \pm 1/4$
درصد مهار بیوفیلم تحت تیمار با ترکیب سیپروفلوکساسین و عصاره	$37 \pm 2/32$	$33 \pm 1/5$	$28/5 \pm 0/88$	$23 \pm 3/5$	$35/5 \pm 2/8$	$37/5 \pm 1$	$30/5 \pm 3/8$	$36/5 \pm 1/2$	$26 \pm 1/5$	$33/5 \pm 0/0$

نتایج بررسی اثر سیپروفلوکساسین و عصاره موروس نیگرا بر بیان ژن *pslA*

جهت اطمینان از حضور ژن *pslA* در جدایه های مورد مطالعه سودوموناس آئروژینوزا، حضور این ژن ها در واکنش PCR بررسی گردید. این ژن در تمام جدایه های مولد بیوفیلم شناسایی شد.

در دو جدایه بیوفیلم قوی سودوموناس آئروژینوزا تحت تیمار با غلظت های Sub MIC و Sub FBIC مواد مورد مطالعه شامل عصاره موروس نیگرا به تنهایی، سیپروفلوکساسین به تنهایی و ترکیب عصاره موروس نیگرا-سیپروفلوکساسین، بیان ژن *pslA* در واکنش Real-time PCR بررسی شد. در همه این موارد بیان ژن های مورد بررسی نسبت به کنترل کاهش نشان داد ($P < 0.05$). بیشترین اثر مهاری مربوط به استفاده از ترکیب عصاره و آنتی بیوتیک بود و پس از آن سیپروفلوکساسین در مقایسه با عصاره موروس نیگرا کاهش بیشتری در بیان ژن مورد مطالعه القا کرد (شکل ۱).



شکل ۱- نتایج بررسی اثر آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین و عصاره موروس نیگرا و ترکیب آن ها بر بیان ژن psIA در جدایه های MDR سودوموناس آئروژینوزا

بحث و نتیجه گیری

بروز مقاومت های دارویی در باکتری ها از معضلات بهداشتی مهم در دنیاست. بویژه درون بیوفیلیم، باکتریها قادر هستند که از طریق کوروم سنسینگ باهم ارتباط برقرار کنند و بیشتر از فرم پلانکتونی به آنتی بیوتیک ها، مواد ضد عفونی کننده و دترجنت ها مقاومت نشان میدهند^{۱۳}. سودوموناس آئروژینوزا یک بیماریزای فرصت طلب است و افزایش روز افزون مقاومت باکتری که امروزه به شکل مقاومت چند گانه درآمد بیماران مبتلا به این باکتری را با مشکلات متعددی مواجه ساخته است. با توجه به اهمیتی که بیوفیلیم در بیماریزایی و مقاومت آنتی بیوتیکی سودوموناس آئروژینوزا ایفا میکند تلاش برای یافتن مواد ضد میکروبی جدیدی که بتواند در تراکم کمتر، باکتری های مولد بیوفیلیم را از بین ببرد یک امر ضروری به نظر می رسد. در این میان استفاده از گیاهان دارویی یک گزینه مناسب به نظر می رسد. گیاهان با اثرات ضد میکروبی با مکانیسم های مختلف و متفاوت از آنتی بیوتیک رشد باکتری ها را مهار می کنند و این امر لزوم تحقیقات جامع تری در زمینه گیاهان دارویی را گوشزد می کند^{۱۴}.

انواع زیادی از مولکولها با پتانسیل فعالیت ضد میکروبی از متابولیسم ثانویه گیاهان تولید می شوند. اخیراً متابولیت های ثانویه

گیاهان دارویی مانند اسانس ها و عصاره های گیاهی از نظر اثرات ضد میکروبی شان مورد بررسی قرار گرفته اند و مشخص شده است که اغلب اسانس ها و عصاره های استخراج شده از گیاهان دارویی دارای خواص ضد قارچی، ضد انگل، ضد باکتری و ضد ویروس میباشند برای مثال، اسانس دو گونه گیاه بابونه (بابونه آملانی و بابونه کبیر) دارای اثرات بازدارندگی رشد باکتری های مهمی مانند استافیلوکوکوس اورئوس، گونه های باسیلوس و لیسرتیا مونوسیترنژ است. همچنین مشخص شده است که عصاره متانولی و آبی گیاه بر روی هفت باکتری از هشت باکتری بیماریزای مهم مورد مطالعه مانند سودوموناس آئروژینوزا، استرپتوکوکوس موتانس و ای کلای تأثیر مناسبی داشت. گیاهان دارویی نه تنها در درمان بیماریهای عفونی نقش دارند بلکه به طور هم زمان تعداد زیادی از اثرات جانبی را که اغلب با مصرف آنتی بیوتیک همراه هستند، کاهش میدهند^{۱۳}.

در این مطالعه بعد از جداسازی و تشخیص آزمایشگاهی باکتری سودوموناس آئروژینوزا تعداد ۱۰ جدایه با مقاومت آنتی بیوتیکی چند گانه، مقاوم به سیپروفلوکساسین و مولد بیوفیلیم جهت انجام مطالعه انتخاب شدند. عصاره موروس نیگرا به تنهایی بر رشد و تشکیل بیوفیلیم سودوموناس آئروژینوزا اثر مهاری نشان داد. در

ترکیب با آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین نیز از ۱۰ جدایه مورد بررسی در ۶ جدایه عصاره موروس نیگرا و آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین اثر هم افزایی نسبی و در ۴ جدایه اثر افزایشی بر مهار رشد جدایه های مورد مطالعه داشتند. همچنین در بررسی فنوتیپی اثر ترکیب عصاره موروس نیگرا و آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین بر مهار بیوفیلم سودوموناس آئروژینوزا در ۱۰ جدایه مورد بررسی، افزایشی بود. همچنین در جدایه های منتخب سودوموناس آئروژینوزا تحت تیمار با غلظت های Sub MIC و Sub FBIC مواد مورد مطالعه، بیان ژن بیوفیلم *pslA* نسبت به کنترل کاهش نشان داد و بیشترین اثر مهاري مربوط به استفاده از ترکیب عصاره و آنتی بیوتیک بود. در مطالعه مشابهی در سال ۲۰۱۱ فعالیت ضد میکروبی آب تازه میوه شاه توت در شرایط آزمایشگاهی در برابر باکتری های گرم مثبت و منفی (استافیلوکوکوس اورئوس، انتروکوکوس فکالیز، اشریشیا کلی، سالمونلا تیفی موریوم، سودوموناس آئروژینوزا، باسیلوس اسپیزنی، باسیلوس سوبتلیس و کورینه باکتریوم دیفتری) مورد بررسی قرار گرفت و حداکثر هاله عدم رشد در برابر سودوموناس آئروژینوزا با ۱۹/۸۷ میلی متر بوده گزارش شد.^{۱۴}

همچنین در سال ۲۰۱۵ توسط شوکلا و همکارانش خاصیت ضد میکروبی دانه شاه توت بر روی باکتری های گرم منفی و مثبت باسیلوس سرئوس، استافیلوکوکوس اورئوس، سالمونلا و سودوموناس آئروژینوزا بررسی شد. بیشترین قطر هاله عدم رشد عصاره اتیل استات در بین باکتری های گرم منفی مربوط به سودوموناس آئروژینوزا با قطر هاله عدم رشد ۱۳/۸۲ میلی متر بود.^{۱۵}

در سال ۲۰۱۱، مازیمبا و همکاران به مطالعه ترکیبات آنتی اکسیدانی و ضد باکتری ریشه و پوست درخت شاه توت پرداختند. MIC پوست ساقه درخت شاه توت در برابر استافیلوکوکوس اورئوس ۱۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر و MIC پوست ساقه شاه توت در باکتری سودوموناس آئروژینوزا ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر گزارش شد. حداقل غلظت بازدارندگی چوب درخت شاه توت در برابر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس ۶۲/۵ و در سودوموناس آئروژینوزا ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر حاصل شد.^{۱۶} همچنین در مطالعات گذشته اثر هم افزایی عصاره های گیاهی و

آنتی بیوتیک ها و استفاده از ترکیب آن ها در کاهش غلظت موثر آنتی بیوتیک ها، کاهش عوارض جانبی و جلوگیری از گسترش مقاومت های دارویی گزارش شده است. در مطالعه ای که در سال ۲۰۲۰ در همدان انجام شد اثر هم افزایی بربرین به عنوان یک مشتق گیاهی با آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین بر سویه های مقاوم به ایمی پنم و سیپروفلوکساسین اسیتو باکتر بومانی بررسی شد. در این مطالعه مشخص شد که بربرین بر مهار رشد و بیوفیلم باکتری اسیتو باکتر بومانی موثر بوده و از طرفی بربرین در ترکیب با ایمی پنم و سیپروفلوکساسین باعث کاهش میزان MIC این آنتی بیوتیک ها و مهار تشکیل بیوفیلم شد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که اضافه کردن بربرین به صورت ترکیب با ایمی پنم باعث شد که میزان MIC نسبت به ایمی پنم در ۵۰ درصد جدایه ها و نسبت به سیپروفلوکساسین در حدود ۴۵ درصد جدایه ها کاهش یابد.^{۱۷}

در پژوهشی در برزیل فعالیت عصاره های گیاهی و آنتی بیوتیک ها و همچنین ترکیب آن ها در مهار تکثیر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس مورد بررسی قرار گرفت و اثر عصاره گیاه Betoni به صورت سینرژیک با آنتی بیوتیک های کلرامفنیکل و جنتامایسین علیه جدایه های استاف اورئوس مقاوم به این داروها تایید شد. همچنین اثر هم افزایی عصاره *Ornatus Plectranthus* با آنتی بیوتیک های آمپی سیلین، کانامایسین و جنتامایسین گزارش گردید.^{۱۸} در پژوهشی اثر ضد باکتریایی عصاره جاتنه در برابر گونه های مقاوم به چند داروی استافیلوکوکوس اورئوس و کلبسیلا پنومونیه به منظور بررسی اثر هم افزایی بین این عصاره و آنتی-بیوتیک ها بررسی شد. نتایج این بررسی اثر متقابل (هم افزایی، افزایشی و بی تفاوتی) بین عصاره و آنتی بیوتیک نشان داد. بسته به سویه باکتری غلظت بازدارنده کسری شاخص از ۰/۰۲ تا ۱/۵ برای سویه های استافیلوکوکوس اورئوس و ۰/۲۵ تا ۲ برای کلبسیلا پنومونیه متغیر بود. بهترین ظرفیت هم افزایی با سفوتاکسیم در برابر سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مشاهده شد، که در آن فعالیت سفوتاکسیم از ۸ به ۱۲۸ برابر افزایش یافت. در نتیجه بررسی ها نشان داد که میتوان از این عصاره به عنوان یک ترکیب آنتی باکتریال و ضد میکروبی در درمان عفونت های مقاوم به چند داروی استافیلوکوکوس اورئوس و کلبسیلا پنومونیه استفاده کرد.^{۱۹}

استفاده از داروهای آنتی بیوتیک موجود باشد و بدین ترتیب عوارض جانبی و هزینه های درمانی بیماری های عفونی را کاهش دهد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد نویسنده اول است. نویسندگان مقاله از حمایت دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت کمال تشکر را دارند.

تعارض در منافع

هیچ گونه تعارض در منافع وجود ندارد.

استفاده از ترکیبات ضد میکروبی گیاهی با کاهش حداقل دوز مورد نیاز آنتی بیوتیک ها، فعالیت ضد میکروبی موثر را تسهیل می کنند. این جالب توجه است زیرا دوز های پایین تر می توانند شانس داشتن عوارض جانبی را کم کنند و همچنین سبب کاهش هزینه های درمانی شوند. با این حال برای استفاده از عصاره های گیاهی با اهداف درمانی باید نحوه عمل آنها مورد بررسی قرار گیرد و مکانیسم های مولکولی تعاملات آنها به دست آید.^{۱۸}

نتیجه گیری

نتایج حاضر در خصوص امکان استفاده از عصاره موریس نیگرا در افزایش اثر آنتی بیوتیک امیدوار کننده است. ممکن است استفاده از این عصاره با و یا به جای آنتی بیوتیک ها راهی برای کاهش

References

- Corehtash ZG, Khorshidi A, Firoozeh F, Akbari H, Aznavah AM. Biofilm formation and virulence factors among *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. *Jundishapur journal of microbiology*. 2015 Oct;8(10).
- Bogiel T, Depka D, Rzepka M, Kwiecińska-Piróg J, Gospodarek-Komkowska E. Prevalence of the genes associated with biofilm and toxins synthesis amongst the *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains. *Antibiotics*. 2021 Feb 28;10(3):241.
- Shafiei M, Ali AA, Shahcheraghi F, Saboori A, Noghabi KA. Eradication of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms Using the Combination of n-butanolic Cyclamen coum Extract and Ciprofloxacin. *Jundishapur journal of microbiology*. 2014 Feb;7(2).
- Mohammadzadeh A, Sharifi A. Bacterial biofilm and its inhibition mechanisms relying on anti-biofilm properties of plant compounds. *Experimental animal Biology*. 2016 Aug 22;5(1):71-81.
- Khameneh B, Iranshahy M, Soheili V, Fazly Bazzaz BS. Review on plant antimicrobials: a mechanistic viewpoint. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*. 2019 Dec;8(1):1-28.
- Haroun MF, Al-Kayali RS. Synergistic effect of *Thymra spicata* L. extracts with antibiotics against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae* strains. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. 2016 Nov;19(11):1193.
- Özgen M, Serçe S, Kaya C. Phytochemical and antioxidant properties of anthocyanin-rich *Morus nigra* and *Morus rubra* fruits. *Scientia horticulturae*. 2009 Feb 3;119(3):275-9.
- Soltan-Dallal M., Didar Z, Assessment the Antimicrobial Impacts of Manganese and Iron Doped Zinc Oxide Nanoparticles against *Shigella Flexneri*. *Journal of Sabzevar University of Medical Sciences*. 2019;26(5):575-584.
- Javid Rad E, Keshavarzi F. Prevalence of *phzM* and *pvdA* virulence genes in *pseudomonas aeruginosa* isolated from Infectious disease ward patients. *Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences*. 2018 Feb 10;22(6):74-83.
- Oliveira VD, Souza MT, Zanotto ED, Watanabe E, Coraça-Huber D. Biofilm Formation and Expression of Virulence Genes of Microorganisms Grown in Contact with a New Bioactive Glass. *Pathogens*. 2020 Nov;9(11):927.
- Vaghry P, Aletaha M. Anti-biofilm effect of peppermint extract on *Pseudomonas aeruginosa* that isolated of hospitalized patients in Tabriz city. *Journal of Neyshabur University of Medical Sciences*. 2019;2(23):73-87.
- Aminnezhad S, Kermanshahi RK, Ranjbar R. Effect of *Althaea officinalis* extract on growth and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Pure and Applied Microbiology*. 2016;10(3):1857-63.
- Foroughi A. A review on medicinal plants; An emphasis on antimicrobial effects. *Veterinary Researches & Biological Products*. 2022 Mar 21;35(1):2-17.
- Khalid N, Fawad SA, Ahmed I. Antimicrobial activity, phytochemical profile and trace minerals of black mulberry (*Morus nigra* L.) fresh juice. *Pak J Bot*. 2011 Dec 1;43(6):91-6.
- Shukla RK, Painuly D, Shukla A, Kumar V, Singh J, Porval A, et al. Physical evaluation, proximate analysis and antimicrobial activity of *Morus nigra* seeds. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2014;7(1):191-8.
- Mazimba O, Majinda R, Motlhanka D. Antioxidant and antibacterial constituents from *Morus nigra*. *Pharmacy and Pharmacology*. 2011;5(6):751-4.
- Mahmoudi H, Zare Fahim N, Alikhani M Y, Shokoohizadeh L. Investigation of antimicrobial effect of Berberine on ciprofloxacin and imipenem resistance *Acinetobacter baumannii* Isolated from Hamadan Hospitals. *Iran J Med Microbiol*. 2020; 14 (1) :44-54.
- Silva DM, COSTA PA, Ribon AO, Purgato GA, Gaspar DM, Diaz MA. Plant extracts display synergism with different classes of antibiotics. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 2019 May 13;91 (2).

Marzieh Aghaie Aliabadi¹,
Leila Asadpour^{2*}

¹MSc, Department of Biology,
Rasht Branch, Islamic Azad
University, Rasht, Iran

²Associate Professor,
Department of Biology, Rasht
Branch, Islamic Azad
University, Rasht, Iran

The Study of antimicrobial and anti-biofilm synergistic effects of ciprofloxacin and *Morus nigra* extract against *Pseudomonas aeruginosa*

Received: 22 Nov 2022 ; Accepted: 24 Aug 2023

Abstract

Background and Aim: *Pseudomonas aeruginosa* is a Gram - negative bacterium and one of the most important opportunity seeker pathogens in hospital infections that are typically obtained simultaneously. This study was carried out with the aim of examining the synergistic effects of the antibiotic ciprofloxacin and extracts of *Morus nigra* in the control of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm.

Materials and Methods: In this study, synergistic effects of ciprofloxacin antibiotic and *Morus nigra* extracts were used to inhibit the growth and biofilm formation of the 10 isolates of multi drug resistant *P. aeruginosa*. Disc diffusion method has been used to determine antibiotic resistance. To examine the synergistic antimicrobial activities between *Morus nigra* extract and ciprofloxacin, Checker titration method was used to calculate the fractional inhibitory concentration (FIC). The effect of *Morus nigra* extract, ciprofloxacin antibiotics and the combination of both of them on the expression level of *pslA* gene was investigated by Real time PCR.

Results: *Morus nigra* extract showed antimicrobial effect against MDR *P. aeruginosa* strains. The use of this extract in combination with ciprofloxacin had an additive effect on inhibition of growth of *P. aeruginosa* and at least 60% reduction in biofilm formation of test isolates was achieved ($P<0.05$). Also, *Morus nigra* extract alone and in combination with ciprofloxacin antibiotic decreased the *pslA* gene expression levels.

Conclusion: The present results are promising in regard to the possibility of using *Morus nigra* extract to increase the effect of sinus for antibiotics infections. The use of this extract, or instead of antibiotics, may be a way of reducing the use of antibiotics, thus reducing the side effects and treatment costs of infectious diseases.

Keywords: Herbal extract, *Morus nigra*, Synergism, Biofilm, *P. aeruginosa*

*Corresponding Author:

Associate Professor,
Department of Biology, Rasht
Branch, Islamic Azad
University, Rasht, Iran

09113383860
L.asadpour@yahoo.com