

اثر اسانس بابونه بر تولید بیوفیلم در سودوموناس آئروژینوزا

حوریه صادری^۱، پرویز اولیاء*^۱، سید رضا هاشمی^۲

۱) گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد

۲) دانش آموخته رشته پزشکی دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد

نویسنده رابط: پرویز اولیاء، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تلفن: ۸۸۹۶۴۷۹۲، owlia@shahed.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۸۶/۶/۲۰ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۶/۷/۲

چکیده:

زمینه و اهداف: سودوموناس آئروژینوزا یکی از باکتری های بیماریزای فرصت طلب بسیار مهم می باشد. سویه های موکوئیدی سودوموناس آئروژینوزا تولید مواد بسیار موکوئیدی می کنند که از آلزینات تشکیل شده است و مهمترین نقش را در تشکیل بیوفیلم دارد. در این مطالعه اثر اسانس بابونه بر تشکیل بیوفیلم در سودوموناس آئروژینوزا مورد بررسی قرار گرفته است.

روش بررسی: از سودوموناس آئروژینوزا 8.8×10^8 CFU/ml به عنوان سویه استاندارد در تشکیل بیوفیلم استفاده شد. برای بررسی اثر ضد میکروبی اسانس بابونه با غلظت ۵۰٪ در DMSO از روش دیسک دیفیوژن استفاده شد. اثر اسانس بر تشکیل بیوفیلم در محیط L.B حاوی غلظت های ۰/۲، ۰/۳۵، ۰/۵ و میکرو گرم از اسانس در میلی لیتر و بعد از گرمخانه گذاری به مدت ۲۴ ساعت در 37°C به روش Fonseca اندازه گیری شد. از محیط کشت تلقیح شده بدون اسانس به عنوان شاهد منفی استفاده شد.

یافته ها: اسانس بر باکتری فاقد خاصیت ضد میکروبی بود، و در حضور اسانس با غلظت های $0.2 \mu\text{g/ml}$ و $0.35 \mu\text{g/ml}$ تولید بیوفیلم اختلاف معناداری با شاهد مثبت نداشت، اما تولید بیوفیلم در حضور $0.5 \mu\text{g/ml}$ اسانس، کاهش معناداری نسبت به شاهد مثبت داشت.

نتیجه گیری: هر چند اسانس بابونه اثر ضد میکروبی بر روی سودوموناس آئروژینوزا ندارد، اما باعث کاهش تولید بیوفیلم می گردد. از آنجا که تشکیل بیوفیلم یکی از فاکتورهای بیماریزایی در سویه های موکوئیدی می باشد، لذا احتمالاً با مطالعات بیشتر امکان کنترل عفونت های مربوطه با استفاده از این نتایج نیز وجود دارد.

کلید واژه ها: سودوموناس آئروژینوزا، بیوفیلم، بابونه

مقدمه:

سودوموناس آئروژینوزا یک باسیل گرم منفی هوازی اجباری است، که فلور طبیعی پوست و دستگاه گوارش انسان است و در آب و خاک نیز یافت می‌شود (۱). سودوموناس آئروژینوزا یک بیماریزای فرصت‌طلب و یکی از مهمترین عوامل عفونت‌های بیمارستانی در طیف وسیعی از بیماران دارای نقص سیستم ایمنی شامل مبتلایان به بدخیمی‌ها، سیستمیک فیبروزیس، سوختگی‌ها و ... است. این باکتری دارای عوامل بیماریزای متعدد می‌باشد و مقاومت زیادی نسبت به اکثر آنتی‌بیوتیک‌های متداول دارد. حضور گلیکوکالیکس در این باکتری سبب می‌شود که اتصال باکتری به سلول میزبان و تشکیل میکرو کلنی به سهولت صورت پذیرد. همچنین سبب تشکیل بیوفیلم شده، از این طریق باکتری در برابر سیستم بیگانه‌خواری و نفوذ مواد ضد میکروبی محافظت می‌شود (۲،۳). مقاومت این باکتری که به صورت مقاومت‌های چندگانه درآمده، روبه افزایش است و این روند رو به افزایش در مراکز مختلف درمانی و همچنین در ایران به اثبات رسیده است (۴).

با توجه به مقاومت زیاد باکتری به آنتی‌بیوتیک‌های متداول و هزینه نسبتاً بالا و عوارض این داروها، استفاده از گیاهان دارویی در دو دهه اخیر رواج زیادی یافته است. در بین این گیاهان، بابونه به صورت‌های مختلف به بازار عرضه شده است. بابونه دارای اثرات متفاوتی است و بیشترین اثر آن خاصیت آرام‌بخشی و ضدالتهابی است و بر روی اثر ضد میکروبی آن بر سودوموناس آئروژینوزا کمتر کار شده است. از آنجا که بابونه یکی از گیاهان بومی ایران است و مطالعات گسترده‌ای بر روی آن صورت گرفته است، لذا بررسی اثرات ضد میکروبی آن می‌تواند منجر به دستیابی اطلاعات مفیدی شود. هدف از انجام این مطالعه بررسی اثر اسانس بابونه در تولید بیوفیلم در سودوموناس آئروژینوزا ۸۸۲۱M که سویه استاندارد برای مطالعات بیوفیلم است می‌باشد.

مواد و روش‌ها:

تهیه باکتری و اسانس: میکروارگانیسم بکار رفته در این تحقیق سویه استاندارد سودوموناس آئروژینوزا ۸۸۲۱M بود که توسط ایزابل سا - کوریه (لیسبون - پرتغال) در اختیار گذاشته شده است. این باکتری به صورت لیوفیلیزه نگهداری شده و در هنگام نیاز بر روی محیط مناسب تلقیح می‌شد (۵،۶). اسانس مورد نظر از گل بابونه (*Matricaria chamomilla* L.) وارسته Sorokasri به روش هیدرو دیستیلیشن توسط شرکت زردبند (تهران- ایران) تهیه شد.

بررسی اثر ضد میکروبی به روش دیسک دیفیوژن: سه عدد پلیت حاوی محیط مولر- هیتون آگار تهیه شد. سپس از کشت ۲۴ ساعته باکتری سودوموناس آئروژینوزا ۸۸۲۱M سوسپانسیونی با کدورت معادل ۰/۵ مک‌فارلند تهیه شد و از آن با استفاده از سوپ استریل روی ۳ پلیت تلقیح شد. سپس روی ۹ عدد دیسک بلانک استریل مقدار ۱۰ μl محلول استوک اسانس (حاوی ۵۰٪ اسانس و ۵۰٪ DMSO) اضافه گردید، سپس روی هر یک از ۳ پلیت تلقیح شده ۳ عدد دیسک قرار داده و بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در ۳۷ °C، قطر هاله عدم رشد اندازه‌گیری شد (۶). از دیسک بلانک حاوی ۱۰ μl دی متیل سولفوکساید (DMSO) نیز به عنوان شاهد استفاده گردید.

روش اندازه‌گیری تشکیل بیوفیلم: از باکتری تازه که ۲۴ ساعت کشت داده شده بود توسط اسپکتوفتومتری سوسپانسیون باکتری با غلظت OD₆₂₀ = 0.01 تهیه شد و مقدار ۱۹۰ μl از محیط کشت مولر- هیتون براث در چاهک پلیت ۹۶ چاهکی ریخته شد و سپس به مقدار ۱۰ μl از سوسپانسیون باکتری (OD₆₂₀ = 0.01) به آن اضافه شد. بعد پلیت را به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷ °C گذاشتیم. بعد از ۲۴ ساعت پلیت را درآورده و محتویات آن را خالی کرده و سه بار با آب مقطر شستشو دادیم. سپس ۲۰۰ μl از محلول سافرانین ۰/۰۲۵٪ به آن اضافه کرده (۰/۰۲۵ gr) از پودر سافرانین در ۱۰۰ cc آب مقطر)، پس از ۲ دقیقه با آب مقطر شستشو داده و سپس ۲۰۰ μl محلول اتانول-استون (۷/۷) ۵۰/۵۰) به هر چاهک اضافه کرده و بعد از ۱۵ دقیقه با دستگاه الیزا در طول موج ۴۹۲ nm، مقدار OD خوانده شد (۷).

روش بررسی اثر اسانس در تولید بیوفیلم: برای انجام این کار مقدار ۱۹۰ μl از هر یک از محیط کشت‌های تهیه شده به شرح ذیل در چاهک‌های پلیت ۹۶ چاهکی از جنس پلی استایرن ریخته می‌شد:

در چاهک اول محیط کشت بدون اسانس که همان شاهد مثبت بود، ریخته شد. در چاهک دوم از محیط کشت با غلظت ۰/۲ μg/ml ریخته شد. در چاهک سوم از محیط کشت با غلظت ۰/۳۵ μg/ml ریخته شد. در چاهک چهارم از محیط کشت با غلظت ۰/۵ μg/ml ریخته شد و در چاهک پنجم از محیط کشت بدون اسانس و بدون سوسپانسیون باکتری که شاهد منفی بود ریخته شد. سپس مقدار ۱۰ μl از سوسپانسیون تازه باکتری با غلظت OD₆₂₀=0.01 به چاهک‌های یک تا چهارم اضافه و در چاهک

یافته ها:

نتایج حاصل از بررسی اثر ضد میکروبی به روش دیسک دیفیوژن: نتایج حاصل نشان داد که این اسانس به روش یاد شده فاقد اثر ضد میکروبی بوده و حلال نیز فاقد اثر ضد میکروبی بر باکتری مورد مطالعه می باشد.

نتایج حاصل از آزمایش اندازه گیری تشکیل بیوفیلم در نمونه شاهد مثبت در مقایسه با شاهد منفی: همانطور که گفته شد از محیط کشت تلقیح شده بدون اسانس به عنوان شاهد مثبت و از محیط کشت تلقیح نشده بدون اسانس به عنوان شاهد منفی استفاده گردید. نتایج نشان می دهد که مقدار OD در شاهد مثبت بیشتر از شاهد منفی است. این اختلاف از نظر آماری معنادار بود (جدول ۱). نتایج حاصل از آزمایش سنجش میزان تشکیل بیوفیلم باکتری: در این روش مقادیر تولید بیوفیلم تولید شده توسط باکتری در محیط کشت های حاوی ۳ غلظت متفاوت اسانس ($0.5 \mu\text{g/ml}$ ، $0.35 \mu\text{g/ml}$ و $0.2 \mu\text{g/ml}$) به طور جداگانه اندازه گیری شد. در این روش مقادیر جذب بدست آمده با مقادیر شاهد مثبت مقایسه شد و مقادیر بیوفیلم هر نمونه بدست آمد. نتایج نشان داد که در غلظت $0.5 \mu\text{g/ml}$ اسانس، مقدار بیوفیلم تولید شده در نمونه تست در مقایسه با نمونه شاهد مثبت (بدون اسانس) کاهش داشته و این کاهش از نظر آماری معنادار می باشد (جدول ۲) اما در غلظت های $0.35 \mu\text{g/ml}$ و $0.2 \mu\text{g/ml}$ اسانس با بونیه، مقدار OD به دست آمده تفاوت معناداری با نمونه شاهد مثبت نداشت.

پنجم بجای سوسپانسیون باکتری، آب مقطر استریل اضافه شد. سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای 37°C انکوباسیون گردید. بعد از ۲۴ ساعت پلیت را از انکوباتور برداشته و کار را زیر هود استریل ادامه داد، بدین صورت که محتویات داخل چاهک را خالی کرده و سه بار چاهک هایی که محتوی سوسپانسیون و محیط کشت و حتی محیط کشت بدون سوسپانسیون بوده اند با آب مقطر شسته شدند. در این مرحله باکتری در دیواره پلیت می توانست بیوفیلم تشکیل داده باشد، به جز در چاهک پنجم که سوسپانسیون باکتری نداشت. سپس مقدار $200 \mu\text{l}$ از محلول 0.25% درصد سافرانین به مدت دو دقیقه به هر چاهک ها اضافه شد. در این مرحله بیوفیلم های تشکیل شده به خود رنگ می گیرند و بعد از ۲ دقیقه سافرانین را خالی کرده و سه بار با آب مقطر شسته شدند. سپس به مقدار $200 \mu\text{l}$ از محلول اتانول-استون ($50/50$) به مدت ۱۵ دقیقه به هر چاهک اضافه شد. در این مرحله رنگ های سافرانین که وارد بیوفیلم شده بودند آزاد می شدند و بعد در دستگاه الیزا با طول موج 492 nm خوانده می شد. بدین صورت هر چه بیوفیلم بیشتر تشکیل شده بود، مقدار بیشتری رنگ به خود جذب کرده و پس از اضافه کردن الکل- استون، رنگ بیشتری نیز تولید می کرد و نهایتاً جذب بیشتری در دستگاه الیزا ثبت می گردید (۷).

محاسبه آماری: هر آزمایش ۶ بار تکرار شد و از روش Paired *t*- test با $\alpha=0.05$ ، اختلاف بدست آمده مقایسه و بررسی شد (۷).

جدول ۱: مقادیر OD در شاهد مثبت و شاهد منفی در محیط کشت بدون اسانس با بونیه در طول موج 492 nm

تکرار	مقدار OD در نمونه شاهد مثبت بدون اسانس	مقدار OD در نمونه شاهد منفی بدون اسانس*
۱	۰/۰۷۶	۰/۰۴۳
۲	۰/۰۷۳	۰/۰۴۴
۳	۰/۰۷۲	۰/۰۴۴
۴	۰/۰۷۰	۰/۰۴۳
۵	۰/۰۶۳	۰/۰۴۱
۶	۰/۰۷۹	۰/۰۴۲

*مقدار OD به صورت بارز نسبت به نمونه شاهد مثبت کاهش داشت

جدول ۲: مقادیر OD بدست آمده در نمونه های تست و شاهد مثبت با تعداد باکتری برابر در محیط کشت حاوی ۰/۵ μg/ml اسانس بابونه

مقدار OD در نمونه بدون اسانس (شاهد مثبت)	مقدار OD در نمونه حاوی اسانس (تست) *	تکرار
۰/۰۷۶	۰/۰۶۵	۱
۰/۰۷۳	۰/۰۶۷	۲
۰/۰۷۲	۰/۰۶۵	۳
۰/۰۷۰	۰/۰۶۵	۴
۰/۰۶۳	۰/۰۶۳	۵
۰/۰۷۹	۰/۰۶۵	۶

*مقدار OD به صورت بارز نسبت به نمونه شاهد مثبت کاهش داشت

بحث:

سودوموناس آئروژینوزا به عنوان یک بیماریزای فرصت طلب یکی از عوامل مهم ایجاد عفونت در بیماران با سیستم ایمنی ضعیف می باشد. این باکتری با داشتن عوامل بیماریزای متعدد و مقاوم بودن به اکثر آنتی بیوتیک های متداول، درمان این بیماری ها را با مشکلات متعددی مواجه ساخته است (۸،۹).

افزایش روزافزون این مقاومت به شکل مقاومت های چندگانه درآمده، به طوری که روند رو به افزایش مقاومت این باکتری در مراکز مختلف درمانی و همچنین در ایران به اثبات رسیده است (۴). درخصوص این باکتری شاید مهمترین نقش کپسول (آلژینات) اتصال باکتری به میزبان و ایجاد بیوفیلم در سطوح آسیب دیده مانند نواحی سوخته و در افراد مبتلاء به سیستمیک فیبروزیس می باشد (۱، ۸، ۹).

مطالعات مختلف نشان داده است که غلظت های پائین تر از مهارکنندگی رشد باکتری (Sub-MIC) می تواند بر روی تولید بیوفیلم موثر باشد. برای مثال در مطالعه *fonseca* و همکاران مشاهده شده است که غلظت های Sub-MIC پیراسیلین/تیکارسیلین باعث کاهش تولید بیوفیلم می شود. این موضوع برای سایر فاکتورهای بیماریزایی نیز به اثبات رسیده است (۷).

در مطالعه ای Warren و همکاران، نشان داده شده است که تویرامایسین و جتتامیسین در غلظت های Sub-MIC می تواند باعث کاهش سطح تولید پروتئازها در سودوموناس گردد (۱۰). همچنین در مطالعات دیگر نیز مشخص شده است که اریترومایسین، کلاریترومایسین و آزیترومایسین می توانند باعث کاهش تولید و اثر

الاستاز و پروتئازها در غلظت های Sub-MIC شوند (۱۲). در واقع این بررسی ها بدین لحاظ صورت گرفته است که در صورت اثر آنتی بیوتیک در غلظت های پائین، بتوانند از آن به عنوان یک عامل پیش گیرنده و کنترل کننده عفونت استفاده نمایند. امروزه توجه ویژه ای به اثرات ضد میکروبی گیاهان دارویی شده است و مشخص گردیده که بسیاری از این گیاهان دارای اثرات ضد میکروبی می باشند. مطالعات متعددی نشان داده است که اکثر این گیاهان فاقد اثر ضد میکروبی بر روی سودوموناس آئروژینوزا می باشند (۱۲، ۱۳). در بین گیاهان مختلف، گیاه بابونه آلمانی با نام علمی *Matricaria chamomilla* L. به عنوان یک گیاه با اثرات مختلف یاد شده است. از جمله این اثرات می توان به اثرات ضد التهابی، مقوی معده (ضد اسهال)، التیام دهنده زخم و سوختگی، دیورتیک، معرق، ضد اسهال، ضد قارچ، میکروب کش، بادشکن، اشتها آور، هضم کننده غذا، صفرابر، قاعده آور، درمان دمل و جوش، درمان تب، درمان ناراحتی مفاصل، دفع سنگ کلیه، درمان ناراحتی چشمی، درمان یرقان، خواب آور و آرام بخش، خلط آور، درمان آفت، درمان کولیت کودکان، ضد تشنج، درمان انواع دردها، ضد عفونی کننده و ... اشاره کرد (۱۲).

در بین اثرات، اثر ضد التهابی و ضد میکروبی گیاه حائز اهمیت می باشد. در برخی مطالعات و از جمله همین مطالعه نشان داده است که اسانس این گیاه بر روی سودوموناس آئروژینوزا فاقد اثر ضد میکروبی است. در طراحی این تحقیق این سؤال مطرح گردید که هرچند که این اسانس فاقد اثر ضد میکروبی می باشد، اما آیا بر روی فاکتورهای بیماریزایی باکتری نیز اثر دارد. در بررسی های صورت گرفته مشخص گردید که این موضوع مورد تحقیق سایرین قرار نگرفته است. از آنجا که هدف اصلی در این سری از مطالعات،

کاهش تولید بیوفیلم اعمال می‌کند، اما مطالعات نشان می‌دهد که بیشترین اثرات بیولوژیکی اسانس بابونه از این قسم مربوط به ترکیباتی همچون کامازولن و بیزابولول می‌باشد. برای حصول به این نکته که واقعاً کدام یک از این ترکیبات به تنهایی و یا در کنار هم چنین اثری را اعمال می‌کند، نیاز به مطالعات بیشتری دارد. همچنین برای رسیدن به هدف نهایی که همانا تولید داروی گیاهی ضد سودوموناس می‌باشد، مطالعات دیگری نیز چه از دیدگاه ایمونولوژیکی و چه از نظر کلینیکی باید بر روی این گیاه صورت گیرد.

نتیجه گیری:

هرچند یافته‌های این تحقیق نشان داده است که اسانس این گیاه در غلظت $0.5 \mu\text{g/ml}$ بر روی تولید بیوفیلم اثرگذار می‌باشد، اما این سؤال همچنان باقی مانده است که آیا اسانس بر روی فاکتورهای ویروالانس دیگر باکتری از جمله آگزوتوکسین A و S و پروتئازها و لیپاز و غیره نیز اثر دارد یا خیر. لذا برای حصول به نتیجه نهایی که همان تولید داروی گیاهی می‌باشد نیازمند طراحی‌های آزمایش‌های *In vivo* و *In vitro* متعدد دیگر می‌باشیم.

یافتن داروهای مناسب در کنترل عفونت سوختگی می‌باشد، لذا این فرضیه شکل گرفت که چنانچه اسانس بابونه بتواند تولید بیوفیلم را کاهش دهد، لذا می‌توان از آن به عنوان یک افزودنی در پمادهای سوختگی استفاده کرد. در این صورت طراحی‌های مختلف صورت گرفت و نهایتاً بعد از آزمایش‌هایی که مشروح آنها آورده شده است، مشخص گردید که سویه‌های موکوتیدی سودوموناس آئروژینوزای ۸۸۲۱M که یک سویه استاندارد برای مطالعات درمورد بیوفیلم می‌باشد، چنانچه در معرض اسانس بابونه قرار بگیرد، در غلظت $0.5 \mu\text{g/ml}$ نسبت به شاهد مثبت باعث کاهش تولید بیوفیلم می‌شود. نتایج حاصل از بررسی آماری در شاهد مثبت و منفی نشان دهنده تشکیل بیوفیلم در شاهد مثبت است. با آنالیز GC/MS اسانس در مطالعه قبلی مشخص گردید که ترکیبات متفاوتی با غلظت‌های متفاوت در آن وجود دارد که از جمله آنها می‌توان به β -Farnesene (E)- α -Bisabolol oxide، α -Bisabolol، α -Bisabolol، α -Bisabolol، Chamazulene (۱۲/۴٪) و Hexadecanole (۵/۶٪) اشاره کرد (۱۳). برای نگارندگان مشخص نمی‌باشد که کدام یک از این اجزاء چنین اثری را در

فهرست مراجع:

- Brooks GF, Butel JS, Morse SA. *Medical Microbiology*, 22nd ed. New York; Mc Graw Hill. 2001; pp: 229- 237.
- Anwar H, Biesen TV, Dasgupta M, Lam K, Costerton JW. Introduction of biofilm bacteria with antibiotics in a novel in vitro chemostat system. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 60: 539-574.
- Rusell NJ, Gacesa P. Chemistry and biology of the alginate of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Mol Aspects Med* 1988; 10:1- 91.
- Rastegar Lari A, Alaghebandan R. Nosocomial infections in an Iranian Burn Center. *Burnns* 2000; 26: 737- 740.
- Alzoreky NS, Nakahara K. Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. *Inter J Food Microbiol* 2003; 20: 223- 230.
- Ojala T, Remes S, Haansuu P, Vuorela H, Hiltunen R, Haohtela K, Vuorela P. Antimicrobial activity of some coumarin containing herbal plants growing in Finland. *J Ethnopharmacol* 2000; 73: 299- 305.
- Fonseca AP, Extermina C, Fonseca AF, Sousa JC. Effect of subinhibitory concentration of piperacillin/tazobactam on *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol* 2004; 53: 903- 910.
- ادیب فر پ. میکروبی‌شناسی پزشکی، تهران، موسسه فرهنگی نوردانش، ۱۳۷۹، صص، ۵۸۵.
- کاسپر د. اصول طب داخلی هاریسون ۲۰۰۵، بیماریهای عفونی (باکتریال)، ترجمه محقق منتظری س. تهران، انتشارات تیمورزاده، ۱۳۸۴، صص، ۳۸۰-۳۶۸.
- Warren RL, Baker NR, Johnson J, Stapleton MJ. Selective inhibition of the accumulation of extracellular proteases of *Pseudomonas aeruginosa* by gentamicin and tobramycin. *Antimicrob Agents Chemother* 1985; 27: 468- 472.
- Molinari G, Guzman CA, Pesce A, Schito GC. Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa*

virulence factors by sub inhibitory concentrations of azithromycin and other macrolide antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 1993; 31: 681- 688.

۱۲. میرحیدر ح. معارف گیاهی، کاربرد گیاهان در پیشگیری و درمان بیماریها، دفتر نشر فرهنگ اسلامی، ۱۳۷۵، صص، ۹۴-۱۰۸.

13. Owlia P, Rasooli I, Sadari H. Antistreptococcal and antioxidant activity of essential oil from *Matricaria chamomilla* L. *Res J Biol Sci* 2007; 2 (2): 155- 160.

Archive of SID