● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ بیست‌ودوم، شمارهٔ ۲، ص ۱۸۴-۱۷۲، ۱۳۹۴

مقالهٔ پژوهشی

بررسی قابلیت مهاری عصاره‌های گیاه اکالیپتوس بر فرم منفرد و ساختارهای بیوفیلمی شش سویه میکروبی

زینب محسنی‌پور[۱]، مهدی حسن شاهیان[۲*]، محمد مرادی[۳]

خلاصه

مقدمه: قرارگیری میکروارگانیسم‌ها در ساختاری به نام بیوفیلم موجب حفاظت سلول‌ها در برابر ترکیبات ضد میکروبی شده، مقابله با این ساختارها را دشوار می‌نماید. از آن جا که میکروارگانیسم‌های مولد بیوفیلم عامل بسیاری از مشکلات در صنعت و پزشکی می‌باشند، دستیابی به شیوه‌های نوین برای حذف و مهار این ساختارها ضروری به نظر می‌رسد. از این‌رو، در پژوهش حاضر اثر ضد میکروبی گیاه اکالیپتوس (Eucalyptus camaldulensis) بر فرم منفرد و بیوفیلمی شش باکتری استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس، استرپتوکوکوس پنومونیه، پسودوموناس آئروژینوزا، اشرشیاکلی و کلبسیلا پنومونیه بررسی گردید.

روش: اثربخشی عصاره‌ها بر فرم منفرد با آزمون انتشار دیسک تعیین و مقادیر حداقل غلظت مهارکنندگی (Minimum inhibitory concentration: MIC) و حداقل غلظت کشندگی (Minimum bactericidal concentration: MBC) به روش ماکروبراث دایلوشن به دست آمد. اثرات ضد بیوفیلمی عصاره‌های گیاهی نیز با روش میکروتیتر پلیت بررسی گردید.

یافته‌ها: در مطالعه حاضر قابلیت بالای عصاره‌های گیاه اکالیپتوس در مهار فرم منفرد و بیوفیلمی میکروارگانیسم‌های انتخابی تأیید و مشخص شد که نوع اتانولی عصاره در مهار فرم منفرد کارامدتر از نوع متانولی بود. اثر مهاری عصاره‌ها بر ساختارهای بیوفیلمی به نوع حلال و غلظت عصاره وابسته می‌باشد و بیشترین اثر مهاری بر پدیده تشکیل بیوفیلم باکتری استافیلوکوکوس اورئوس (۸۴/۴۲ درصد) در تیمار با غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره متانولی مشاهده گردید. غلظت‌های انتخابی عصاره‌های اکالیپتوس به طور میانگین قادر به تخریب بیش از ۵۰ درصد ساختارهای بیوفیلمی باکتری‌های مورد بررسی بودند و تنها در تیمار بیوفیلم‌های کلبسیلا پنومونیه تخریب ۲۹/۲۰ درصدی مشاهده شد. عصاره‌های مذکور موجب کاهش قابل توجه فعالیت متابولیکی بیوفیلم‌ها نیز شدند که استرپتوکوکوس پنومونیه بیشترین کاهش (۸۲/۱۳ درصد) را در تیمار با غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره اتانولی نشان داد.

نتیجه‌گیری: قابلیت بالای عصاره‌های اکالیپتوس در مقابله با میکروارگانیسم‌های انتخابی تأیید و این عصاره‌ها به عنوان گزینه مناسبی در مقابله با سویه‌های مذکور پیشنهاد گردید.

واژه‌های کلیدی: بیوفیلم، Eucalyptus camaldulensis، باکتری، مقاومت دارویی، اثر ضد میکروبی

۱- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران ۲- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران ۳- استادیار گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی افضلی‌پور، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران

*** نویسنده مسؤول، آدرس پست الکترونیک:** mshahi@uk.ac.ir

دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۹/۳۰ **دریافت مقاله اصلاح شده:** ۱۳۹۳/۳/۱۷ **پذیرش مقاله:** ۱۳۹۳/۳/۲۸

مقدمه

با وجود پیشرفت‌های روزافزون علم پزشکی و گسترش تکنیک‌های درمانی، روزانه افراد زیادی در سراسر جهان قربانی بیماری‌های عفونی می‌شوند (۱). میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا با شیوه‌های متفاوتی قادر به مقابله با عوامل ضد میکروبی هستند و زندگی در ساختاری به نام بیوفیلم یکی از مهم‌ترین علل پدیده مذکور می‌باشد (۲). بیوفیلم‌های میکروبی از تجمع میکروارگانیسم‌ها بر یک سطح جاندار یا بی‌جان تشکیل می‌شود و دارای ساختمان سه بعدی و پیچیده‌ای می‌باشد. مقاومت بیوفیلم‌ها به عوامل ضد میکروبی موجب شده است تا حذف این ساختارها از مشکلات اصلی کنترل میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و درمان عفونت‌های ناشی از آن‌ها محسوب شود. بیوفیلم‌ها در مطالعات بالینی دهه‌های اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند؛ چرا که باکتری‌های مولد بیوفیلم عامل بیش از ۶۰ درصد عفونت‌های بیمارستانی می‌باشند و گسترش این عفونت‌ها مشکلات بسیاری را در حوزه درمان ایجاد می‌نماید (۴، ۳). عفونت‌های دهانی مانند Periodontitis (التهاب لثه)، Osteomyelitis (التهاب استخوان)، عفونت بر اثر استفاده از ابزارها و تجهیزات پزشکی و بسیاری از عفونت‌های مزمن مواردی از بیماری‌های مرتبط با بیوفیلم‌های میکروبی هستند (۵).

مشکلات ناشی از تشکیل ساختارهای بیوفیلمی توسط میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا، گسترش مقاومت‌های دارویی و اثرات زیانبار استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها، ضرورت دستیابی به ترکیبات جدید با خواص ضد میکروبی مناسب را تبیین می‌نماید. امروزه ترکیبات گیاهی به عنوان راه مطمئن برای مهار میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا بسیار مورد توجه می‌باشد. سابقه طولانی به کارگیری گیاهان در طب سنتی، هزینه پایین تولید، عدم بروز مشکلات زیست محیطی و مقاومت‌های دارویی همه جزء مواردی است که مشتقات گیاهی را به گزینه مناسبی برای مهار سویه‌های میکروبی مقاوم به دارو تبدیل نموده است (۷، ۶).

اکالیپتوس یکی از گیاهان پرکاربرد در طب سنتی و دارای خواص دارویی بسیاری است و با نام علمی Eucalyptus متعلق به خانواده Myrtaceae معرفی می‌شود. اکالیپتوس درختی به ارتفاع ۳۵-۵ متر با برگ‌های کشیده و دارای بافت پارانشیمی حاوی کیسه‌های ترشحی دارای اسانس است که در زمین‌های باتلاقی و وابسته به گونه خود در آب و هوای نیمه خشک و خاک به نسبت آهکی و ماسه‌ای بهتر رشد می‌نماید. اکالیپتوس حاوی روتین، مواد رزینی مختلف، اکالیپتیک اسید و مقدار زیادی تانن می‌باشد و از خواص درمانی آن می‌توان به تب‌بری، ضد دیابت، ضد سوزاک، ضد انگل، ضد آسم و ضد اسهال اشاره نمود. برگ‌های این گیاه نیز برای درمان سرماخوردگی، آنفلوانزا و ضد عفونی کننده مجاری تنفسی مفید است (۹، ۸). در بررسی‌های انجام شده بر روی عصاره‌ها و روغن‌های فرار، گونه‌های مختلف گیاه اکالیپتوس دارای خواص ضد میکروبی قابل توجهی می‌باشد. برای مثال اثر مهاری عصاره آبی و اتانولی گونه E. camaldulensis بر لیستریا مونوسیتوژنز (۱۰)، استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیاکلی، کلبسیلا پنومونیه، سالمونلا تیفی و پروتئوس میرابیلیس تأیید گردیده است (۱۱).

پژوهش حاضر در آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه شهید باهنر کرمان و با هدف بررسی اثر ضد میکروبی عصاره‌های متانولی و اتانولی گیاه اکالیپتوس (Eucalyptus camaldulensis) بر فرم منفرد و بیوفیلم باکتری‌های گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس و استرپتوکوکوس پنومونیه و همچنین باکتری‌های گرم منفی پسودوموناس آئروژینوزا، اشرشیاکلی و کلبسیلا پنومونیه انجام شد. میکروارگانیسم‌های نام برده شده از عوامل بیماری‌زای مهم انسانی هستند و طی سال‌های اخیر با مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف مشکلات بالینی بسیاری را ایجاد نموده‌اند. در حقیقت هدف از این مطالعه، تأیید اثر مهاری عصاره های اکالیپتوس بر فرم منفرد و بیوفیلمی باکتری های انتخابی بود و از آن‌جا که چنین بررسی هایی نخستین قدم برای دستیابی به ترکیبات ضد

میکروبی جدید و پایه مطالعات بعدی می باشد، از اهمیت بالایی برخوردار است. با توجه به مطالعات محدود اثربخشی عصاره‌های گیاهی بر بیوفیلم‌های میکروبی، پژوهش انجام شده می تواند پیشنهادی برای مطالعات در شرایط زنده و بررسی های کلیدی جهت مقابله با ساختارهای بیوفیلمی و مشکلات ناشی از تشکیل آن‌ها بر سطوح مختلف باشد.

روش بررسی

گیاه اکالیپتوس از مراتع طبیعی رشد آن (در حومه شهر کرمان) جمع‌آوری شد. گیاه مذکور در هرباریوم دانشکده علوم دانشگاه باهنر شناسایی و گونه آن تعیین گردید. گیاهان در سایه خشک و پس از آن به کمک آسیاب برقی و الک تا حد ممکن پودر شدند. عصاره‌گیری به روش ماسراسیون و با دو نوع حلال آلی اتانول و متانول صورت گرفت. برای این منظور ۵۰ گرم از پودر گیاه اکالیپتوس به ترتیب به ارلن‌های حاوی اتانول ۸۰ درصد و متانول ۹۶ درصد افزوده و درب ارلن‌ها با ورقه آلومینیومی بسته شد و به مدت ۲۴ ساعت در دستگاه شیکر با سرعت ۱۸۰ دور در دقیقه و دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از آن به منظور حذف قطعات اضافی، محلول حاصل از کاغذ صافی عبور داده شد و عصاره برای حذف حلال اضافی به دستگاه روتاری انتقال یافت. سپس عصاره تغلیظ شده در آون ۴۰ درجه سانتی‌گراد به پودر خشک تبدیل گردید. به منظور تهیه محلول ذخیره عصاره، مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم از پودر خشک عصاره‌های اتانولی و متانولی تهیه شده با افزودن مقدار مناسبی از دی‌متیل سولفوکساید تا حد ممکن حل شد و سپس محلول با عبور از فیلتر میلی‌پور استریل گردید و با افزودن آب مقطر استریل به حجم ۱ میلی‌لیتر رسانده شد. محلول حاصل که غلظتی برابر با ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر داشت، به عنوان محلول ذخیره عصاره تا زمان مصرف در ظروف شیشه‌ای استریل و تیره در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۱۲).

تعیین خواص ضد میکروبی گیاه اکالیپتوس بر باکتری‌های گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس و استرپتوکوکوس پنومونیه و همچنین باکتری‌های گرم منفی پسودوموناس آئروژینوزا، اشرشیاکلی و کلبسیلا پنومونیه انجام شد. استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیاکلی و کلبسیلا پنومونیه سویه‌های جداسازی شده از بیماران بودند 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 جدا شده از خاک بود که از دانشکده علوم دانشگاه باهنر تهیه گردید. کشت مرجع میکروارگانیسم‌های مذکور در یخچال نگهداری و هر ماه در نوترینت آگار (Nutrient agar) تجدید کشت شد. در مورد استرپتوکوک پنومونیه از محیط بلاد آگار (Blood agar) استفاده گردید.

ارزیابی فعالیت ضد میکروبی عصاره‌ها بر فرم منفرد به روش انتشار دیسک

در ابتدا برای تعیین میزان جذب هر دیسک، ۵ دیسک بلانک به ترتیب به مزورهای حاوی ۵ میلی‌لیتر اتانول و متانول وارد گردید و تغییر حجم هر ظرف پس از دو ساعت مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به تغییر حجم و غلظت محلول ذخیره عصاره، میزان عصاره موجود در هر دیسک برآورد شد. بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره اکالیپتوس بر باکتری‌های منتخب به روش انتشار دیسک انجام گردید. ۵ دیسک بلانک استریل در شرایط آسپتیک به محلول‌های ذخیره هر یک از عصاره‌های گیاهی وارد شد و پس از دو ساعت به منظور تبخیر حلال در پلیت استریل به فور ۴۰ درجه سانتی‌گراد انتقال یافت (۱۳). در مطالعه حاضر، دیسک آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل (۳۰ میکروگرم در دیسک) شاهد مثبت و دیسک‌های آغشته به اتانول، متانول و دی‌متیل سولفوکساید شاهد منفی آزمایش بودند.

به منظور انجام آزمون انتشار دیسک، از کشت ۲۴ ساعته باکتری‌های مورد آزمایش در محیط NB (Nutrient broth) استفاده شد. ابتدا هر یک از این سوسپانسیون‌های میکروبی تا رسیدن به کدورتی معادل ۰/۵ McFarland رقیق

شده، سپس نمونه به کمک سواب استریل از هر سوسپانسیون برداشت شد و در محیط MHA (Mueller-Hinton agar) کشت سفره‌ای صورت گرفت. در مرحله بعد دیسک‌های حاوی عصاره، حلال و آنتی‌بیوتیک با پنس استریل در فواصل منظم بر روی محیط قرار گرفتند و پلیت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. قطر هاله‌های مهاری دیسک‌های مذکور پس از انکوباسیون به وسیله خط‌کش میلی‌متری اندازه‌گیری گردید (۱۴).

تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی و حداقل غلظت کشندگی

پس از تأیید خاصیت ضد میکروبی عصاره‌های اتانولی و متانولی گیاه اکالیپتوس، حداقل غلظت مهار کنندگی (Minimum inhibitory concentration یا MIC) عصاره‌های مذکور به روش ماکروبراث دایلوشن (Macrobroth dilution) و طبق پروتکل NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) معین شد (۱۲). از محلول ذخیره عصاره‌های اتانولی و متانولی با روش رقیق‌سازی متوالی (۱۵)، ۱۰ غلظت ۵۰-۰/۰۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه گردید و برای تعیین مقدار MIC به کار رفت. در این آزمون ۱۰ لوله آزمایش استریل انتخاب و به هر لوله ۱ میلی‌لیتر محیط NB استریل افزوده گردید. سپس به لوله اول ۱ میلی‌لیتر از محلول ذخیره عصاره اضافه و به خوبی مخلوط شد. غلظت نهایی محلول مذکور ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود که مقدار ۱ میلی‌لیتر از آن در شرایط آسپتیک به لوله دوم منتقل گردید تا غلظت نهایی در این لوله، نصف لوله اول و برابر ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر شود. به همین ترتیب غلظت‌های بعدی عصاره در لوله‌های سوم تا دهم ساخته شد.

در مرحله بعد ۱میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتری ۲۴ ساعته که در محیط NB رشد کرده و به کدورت ۰/۵ McFarland رسانده شده بود، به هر غلظت افزوده گردید. در این آزمایش لوله‌های شاهد مثبت حاوی سوسپانسیون میکروبی و آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین (۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، لوله‌های شاهد منفی حاوی سوسپانسیون میکروبی و آب مقطر استریل و در نهایت لوله‌های شاهد عصاره حاوی غلظت موردنظر از عصاره و محیط NB بودند. تمامی مراحل ذکر شده در شرایط استریل انجام و لوله‌ها به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از این مدت میزان کدورت ایجاد شده در لوله‌های آزمون با کدورت شاهد منفی و شاهد عصاره مقایسه و کمترین غلظتی که رشد باکتری در آن مهار شده بود به عنوان MIC انتخاب گردید.

برای محاسبه حداقل غلظت کشندگی (Minimum bactericidal concentration یا MBC) عصاره‌های E. camaldulensis از لوله‌های مورد بررسی در MIC، کشت در محیط MHA فاقد عصاره گیاهی انجام گرفت و کمترین غلظتی که باکتری در آن رشد نکرده بود به عنوان MBC تعیین گردید.

سنجش قابلیت عصاره‌ها در ممانعت از تشکیل بیوفیلم

جهت تعیین اثر عصاره‌های گیاه اکالیپتوس بر تشکیل بیوفیلم توسط باکتری‌های بیماری‌زای مورد مطالعه از روش میکروتیتر پلیت استفاده شد. برای این منظور یک لوپ از هر باکتری به محیط TSB (Tryptic soy broth) منتقل و پس از ۱۸ ساعت انکوباسیون تا رسیدن به کدورتی معادل ۱ McFarland رقیق گردید. ۳ غلظت متوالی ۲۰-۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره‌های اتانولی و متانولی اکالیپتوس به روش رقیق‌سازی متوالی و با افزودن محیط TSB استریل تهیه و ۱۰۰ میکرولیتر از هر غلظت در شرایط آسپتیک به چاهک‌های آزمون در میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای وارد شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی به چاهک‌های مذکور اضافه گردید. در این آزمون نیز چاهک شاهد مثبت، شاهد منفی و شاهد عصاره مانند آزمون تعیین MIC در نظر گرفته شد. میکروپلیت مذکور به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد بدون حرکت انکوبه گردید (۱۶).

پس از گذشت زمان انکوباسیون، میکروپلیت با رنگ‌آمیزی کریستال ویوله بررسی شد. در این مرحله ابتدا

چاهک‌ها به آرامی آسپیره و سپس دو بار با بافر سالین فسفات (Phosphate buffered saline یا PBS) شسته شدند. تثبیت ساختارهای بیوفیلمی با افزودن ۱۵۰ میکرولیتر متانول به چاهک‌ها به مدت ۱۵ دقیقه انجام گردید. پس از آسپیره متانول، ۲۰۰ میکرولیتر کریستال ویوله ۱ درصد به چاهک‌ها افزوده و میکروپلیت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. شستشوی رنگ اضافی از چاهک‌ها با جریان آرام آب شیر انجام گرفت و پس از خشک شدن میکروپلیت، ۱۶۰ میکرولیتر اسید استیک گلاسیال ۳۳ درصد به چاهک‌ها افزوده و جذب نوری چاهک‌ها به وسیله دستگاه ELISA reader و در طول موج ۶۳۰ نانومتر خوانده شد (۱۷).

درصد مهار تشکیل بیوفیلم در تیمار با غلظت‌های مختلف عصاره‌های گیاه اکالیپتوس به کمک فرمول زیر محاسبه گردید (۱۸):

$$\text{percent Inhibition} = 100 * \left[\frac{(C-B)-(T-B)}{(C-B)}\right]$$

در این فرمول C میانگین جذب نوری چاهک‌های شاهد منفی، B میانگین جذب نوری چاهک‌های شاهد محیط، T میانگین جذب نوری چاهک‌های آزمون در غلظت موردنظر و E میانگین جذب نوری چاهک‌های شاهد عصاره همان غلظت می‌باشد.

سنجش قابلیت عصاره‌ها در تخریب ساختارهای بیوفیلمی

در این سنجش ابتدا بیوفیلم تشکیل گردید و سپس عصاره‌های گیاهی بر آن اثر داده شد. همچنین محتویات چاهک‌های تیمار و شاهد نیز مانند آزمون MIC انتخاب شد. به منظور تشکیل بیوفیلم، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی که به مدت ۱۸ ساعت در محیط کشت TSB رشد کرده و به کدورتی معادل ۱ McFarland رسانده شده بود، به چاهک‌های آزمون و شاهد منفی وارد و میکروپلیت مذکور به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد بدون حرکت انکوبه گردید. در این میکروپلیت چاهک‌های شاهد محیط کشت و شاهد عصاره نیز حاوی ۱۰۰ میکرولیتر محیط TSB استریل بود. پس از گذشت زمان انکوباسیون، چاهک‌ها با احتیاط و در شرایط آسپتیک تخلیه شده و به منظور حذف سلول‌های پلانکتونیک با محلول PBS دو بار شستشو صورت گرفت. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره‌های گیاهی موردنظر به چاهک‌های تیمار و شاهد عصاره افزوده گردید. به چاهک‌های شاهد محیط کشت ۲۰۰ میکرولیتر و به چاهک‌های شاهد منفی ۱۰۰ میکرولیتر محیط TSB استریل و به چاهک‌های شاهد مثبت ۱۰۰ میکرولیتر آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین با غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر افزوده شد و میکروپلیت بدون حرکت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید (۱۹). جهت بررسی قابلیت هر عصاره در حذف ساختارهای بیوفیلمی تشکیل شده، از رنگ‌آمیزی کریستال ویوله و به همان روشی که در بخش پیش شرح داده شد، استفاده گردید.

سنجش قابلیت عصاره‌ها در مهار فعالیت متابولیکی ساختارهای بیوفیلمی

تست مهار آنزیم دهیدروژناز به منظور سنجش قابلیت عصاره‌های اکالیپتوس در مهار فعالیت متابولیکی سلول‌های جدا شده از ساختار بیوفیلم انجام شد. به عبارت دیگر، با این آزمون می‌توان دریافت که چه تعداد از سلول‌های میکروبی که در تیمار با عصاره گیاهی از ساختار بیوفیلم جدا شده اند، زنده و دارای فعالیت هستند و چه تعداد در مجاورت عصاره فعالیت خود را از دست داده‌اند.

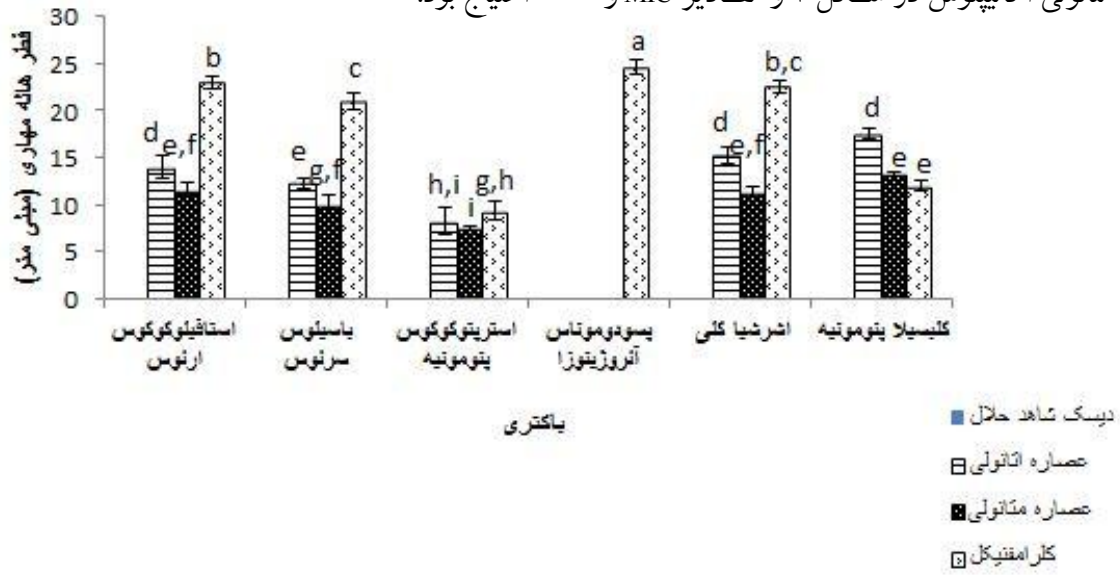
برای تعیین میزان فعالیت آنزیم دهیدروژناز، ابتدا بیوفیلم‌های میکروبی (به همان شیوه که در بخش قبل آمد) تشکیل شده و سپس غلظت‌های هر عصاره بر آن‌ها اثر داده شد. پس از گذشت زمان انکوباسیون، مقدار ۵۰ میکرولیتر از رنگ TTC (Triphenyl tetrazolium chloride) به چاهک‌های تیمار و شاهد اضافه و میکروپلیت به مدت سه ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. پس از این مدت جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ۴۹۰ نانومتر تعیین شد (۲۰).

کلیه آزمون‌های پژوهش حاضر با سه تکرار صورت گرفت. اختلاف بین داده‌ها توسط آزمون ANOVA و در نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۸ (version 18, SPSS Inc., Chicago, IL) انجام شد و سطح معنی‌داری داده‌ها برابر با $P < ۰/۰۵$ بود. اختلافات حقیقی بین گروه‌ها در آزمون انتشار دیسک به کمک آزمون 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 صرف‌نظر و اثرات متقابل عوامل مؤثر در هر آزمایش توسط آزمون LSD (Least significant difference) بررسی شد.

نتایج

قابلیت مهاری عصاره‌های گیاهی بر فرم منفرد

از آن‌جا که کاهش حجم حلال در مجاورت دیسک‌های بلانک ۰/۲ میلی‌لیتر بود، میزان عصاره جذب شده به هر دیسک ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر محاسبه گردید. قطر هاله‌های مهاری اندازه‌گیری شده برای عصاره‌های اتانولی و متانولی اکالیپتوس در شکل ۱ و مقادیر MIC و MBC عصاره‌های مذکور در جدول ۱ ارایه شده است. بر این اساس قدرت مهاری عصاره اتانولی بر فرم منفرد بیشتر از نوع متانولی آن بود. عصاره‌های گیاه اکالیپتوس در آزمون انتشار دیسک قادر به مهار باکتری‌های مورد بررسی در سطح $P < ۰/۰۱$ بودند. بزرگ‌ترین هاله مهاری در آزمون مذکور بر روی باکتری کلبسیلا پنومونیه تشکیل شد؛ در حالی که عصاره‌های گیاه مذکور قادر به ایجاد هاله مهاری بر باکتری پسودوموناس آئروژینوزا نبودند و اثر مهاری بسیار ضعیفی بر استرپتوکوکوس پنومونیه نشان دادند. البته عصاره‌های اکالیپتوس در غلظت بسیار کمتری (۰/۷۸ و ۰/۳۹ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) از غلظت عصاره موجود در دیسک (۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) قادر به مهار پسودوموناس آئروژینوزا در محیط کشت مایع بودند. از این‌رو می‌توان به قابلیت بالای عصاره‌ها در محیط مایع نسبت به محیط جامد اشاره نمود. در این میان اشرشیاکلی بیشترین حساسیت را به عصاره‌های اکالیپتوس در محیط مایع نشان داد و در مقابل برای مهار باکتری استافیلوکوکوس اورئوس به بیشترین غلظت از عصاره احتیاج بود.



شکل ۱. *قطر هاله مهاری عصاره‌های گیاه اکالیپتوس و شاهد آنتی‌بیوتیک و حلال (میلی‌متر)*

حروف مشابه (a، b، c و...) بر اساس آزمون Duncan در سطح ۰/۰۵ اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند

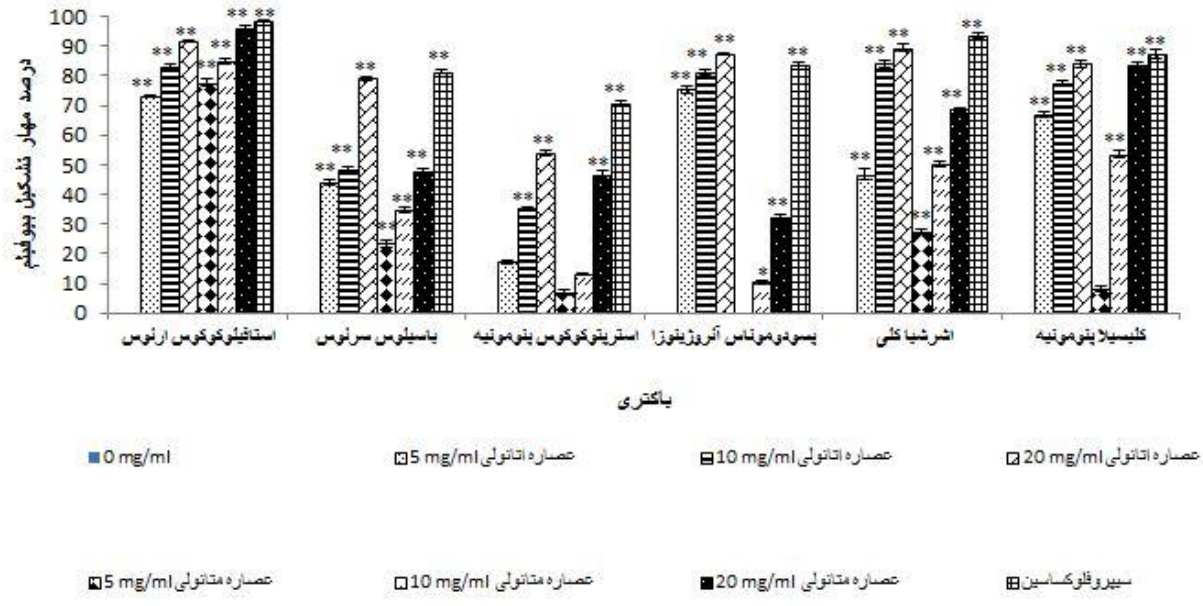
جدول ۱. *مقادیر MIC و MBC عصاره‌های E. camaldulensis (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)*

باکتری	MIC عصاره متانولی	MIC عصاره اتانولی	MBC عصاره متانولی	MBC عصاره اتانولی	رشد در لوله شاهد منفی	رشد در لوله شاهد مثبت
استافیلوکوکوس اورئوس	۳/۱۲	۱/۵۶	۱۲/۵۰	۳/۱۲	+	-
باسیلوس سرئوس	۱/۵۶	۰/۷۸	۳/۱۲	۱/۵۶	+	-
استرپتوکوکوس پنومونیه	۱/۵۶	۳/۱۲	۶/۲۵	۶/۲۵	+	-
پسودوموناس آئروژینوزا	۰/۷۸	۰/۳۹	۳/۱۲	۱/۵۶	+	-
اشرشیاکلی	۰/۳۹	۰/۳۹	۱/۵۶	۰/۷۸	+	-
کلبسیلا پنومونیه	۳/۱۲	۱/۵۶	۶/۲۵	۱/۵۶	+	-

MIC: Minimum inhibitory concentration; MBC: Minimum bactericidal concentration

قابلیت عصاره‌های گیاهی در مهار ساختارهای بیوفیلمی

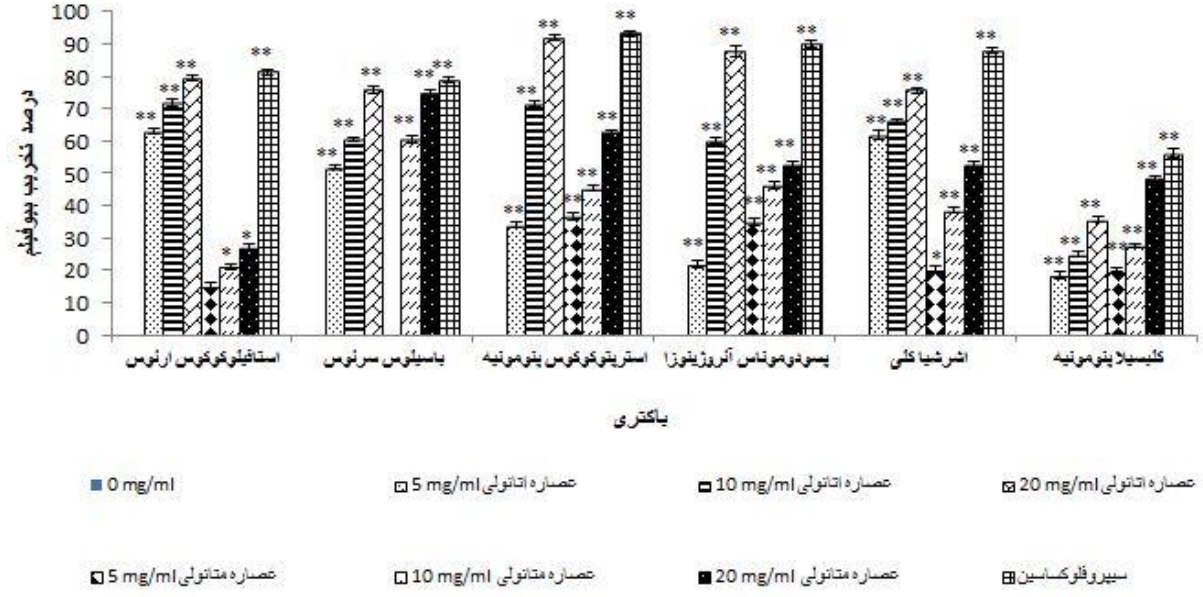
قدرت مهاری هر یک از غلظت‌های انتخابی عصاره‌های اکالیپتوس در مهار پدیده تشکیل بیوفیلم، تخریب ساختارهای بیوفیلمی و مهار فعالیت متابولیکی این ساختارها به ترتیب در شکل‌های ۴-۲ آمده است. با توجه به آزمون ANOVA انجام شده بر روی داده‌های آزمون‌های مذکور، اثر مهاری عصاره‌های اکالیپتوس در این آزمون‌ها معنی‌دار بود ($P < ۰/۰۱$). بر این اساس ساختارهای بیوفیلمی، نوع باکتری، نوع عصاره و غلظت بر قابلیت مهاری آن تأثیر معنی‌داری داشت ($P < ۰/۰۱$).



شکل ۲. *مقایسه اثر مهاری غلظت‌های متفاوت عصاره‌های الکلی گیاه اکالیپتوس، شاهد مثبت (سیپروفلوکساسین ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و منفی (۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) بر تشکیل بیوفیلم باکتری‌های انتخابی*

*مهار معنی‌دار غلظت مورد بررسی در سطح ۰/۰۵

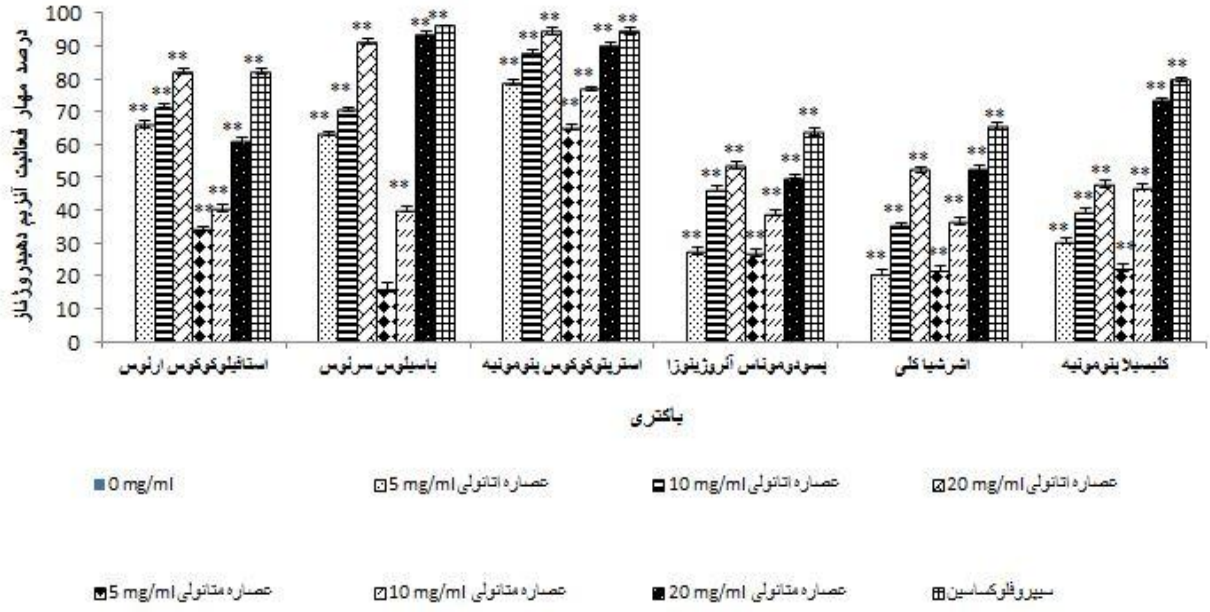
**مهار معنی‌دار غلظت مورد بررسی در سطح ۰/۰۱



شکل ۳. *مقایسه قابلیت غلظت‌های متفاوت عصاره‌های الکلی گیاه اکالیپتوس، شاهد مثبت (سیپروفلوکساسین ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و منفی (۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) در حذف ساختارهای بیوفیلم باکتری‌های انتخابی*

*مهار معنی‌دار غلظت مورد بررسی در سطح ۰/۰۵

**مهار معنی‌دار غلظت مورد بررسی در سطح ۰/۰۱



شکل ٤. *مقایسه اثر غلظت‌های متفاوت عصاره‌های الکلی گیاه اکالیپتوس، شاهد مثبت (سیپروفلوکساسین ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و منفی (۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) در مهار فعالیت متابولیک بیوفیلم باکتری‌های انتخابی*

*مهار معنی‌دار غلظت مورد بررسی در سطح ۰/۰۵

**مهار معنی‌دار غلظت مورد بررسی در سطح ۰/۰۱

در بیشتر بررسی‌های انجام شده بر ساختارهای بیوفیلمی، اثر مهاری انواع اتانولی عصاره‌های گیاه اکالیپتوس بیشتر از نوع متانولی آن بود. در آزمون تشکیل بیوفیلم، بیشترین مهار در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس (۸۴/۴۲ درصد) مشاهده گردید. این در حالی است که عصاره‌های مذکور قابلیت ضعیفی در مهار تشکیل بیوفیلم استرپتوکوکوس پنومونیه (۲۸/۸۵ درصد) داشتند و نوع متانولی عصاره در غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر قادر به مهار تشکیل بیوفیلم باکتری پسودوموناس آئروژینوزا نبود. عصاره‌های اکالیپتوس قادر به تخریب بیش از ۵۰ درصد ساختارهای بیوفیلمی بیشتر باکتری‌های مورد بررسی بودند و کمترین تخریب در بیوفیلم‌های کلبسیلا پنومونیه (۲۹/۲۰ درصد) مشاهده شد. فعالیت متابولیکی بیوفیلم‌ها نیز در تیمار با عصاره‌های گیاه اکالیپتوس به حد قابل توجهی کاهش یافت که استرپتوکوکوس پنومونیه بیشترین کاهش (۸۲/۱۳ درصد) و اشرشیاکلی کمترین کاهش (۳۶/۶۲ درصد) را نشان دادند.

بحث و نتیجه‌گیری

استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها طی دهه‌های اخیر موجب ظهور و گسترش سویه‌های میکروبی مقاوم به دارو شده و مقابله با این عوامل عفونی را دشوارتر نموده است. جایگیری میکروارگانیسم‌ها در ساختارهای بیوفیلمی یکی از مهم‌ترین دلایل مقاومت‌های دارویی می‌باشد؛ چرا که ساختار مذکور مانع نفوذ ترکیبات ضد میکروبی می‌شود و از عملکرد مناسب آن‌ها نیز ممانعت به عمل می‌آورد. از این‌رو دستیابی به راه‌های نوین مقابله با میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا به خصوص در شکل بیوفیلمی ضروری است (۳، ۱). در بررسی‌های انجام شده به منظور دستیابی به ترکیبات ضد میکروبی جدید، مشتقات زیستی مورد توجه ویژه هستند؛ چرا که ماهیت طبیعی این ترکیبات موجب کاهش عوارض جانبی آن‌ها در مقایسه با ترکیبات شیمیایی مرسوم می‌گردد. قیمت مناسب، دسترسی آسان و مقبولیت عام گیاهان دارویی، این ترکیبات را به عنوان گزینه‌های مناسبی برای مقابله با میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا مورد توجه قرار داده است (۷). بدین منظور در پژوهش حاضر خاصیت ضد میکروبی اکالیپتوس بر میکروارگانیسم‌های انتخابی معین و مشخص گردید. چنانچه تغلیظ پس از عصاره‌گیری به روش ماسراسیون انجام شود، خاصیت مهاری عصاره افزایش چشمگیری خواهد داشت.

عصاره‌های اکالیپتوس در آزمون انتشار دیسک قابلیت بالایی در مهار رشد میکروارگانیسم‌های انتخابی نشان دادند. در آزمون مذکور کلبسیلا پنومونیه حساس‌ترین باکتری بود و این در حالی است که اثر مهاری عصاره گیاه اکالیپتوس بر اشرشیاکلی ضعیف و بر پسودوموناس آئروژینوزا بی‌اثر بود. اگرچه عصاره‌های اکالیپتوس در آزمون انتشار دیسک قادر به مهار باکتری پسودوموناس آئروژینوزا نبودند، اما این عصاره‌ها در محیط مایع به کار رفته در آزمون MIC رشد باکتری مذکور را مهار کرده و بر سایر باکتری‌ها نیز اثر مهاری بسیار مناسبی نشان دادند. از آن‌جا که اثر مهاری عصاره‌های گیاه اکالیپتوس بر بیشتر باکتری‌های مورد مطالعه در محیط کشت مایع بسیار بیشتر از محیط جامد است، می‌توان چنین نتیجه گرفت که ترکیبات مؤثره عصاره‌های اکالیپتوس مانند بسیاری از عصاره‌های گیاهی دیگر قابلیت انتشار اندکی در محیط جامد داشته و بر این اساس برای اثرگذاری مطلوب در این محیط به غلظتی بیشتر از غلظت مؤثر در محیط مایع نیاز است. عصاره‌های گیاه اکالیپتوس در مقابله با ساختارهای بیوفیلمی نیز بسیار کارامد بود و اثر مهاری هر عصاره به غلظت و نوع حلال آن و همچنین نوع باکتری مورد بررسی وابسته است.

قابلیت عصاره‌های الکلی اکالیپتوس در مهار پدیده تشکیل بیوفیلم باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیاکلی و کلبسیلا پنومونیه بیشتر از قدرت تخریبی آن‌ها و یا مهار فعالیت متابولیکی سلول‌های ساختار بیوفیلمی بود. در میان باکتری‌های ذکر شده تنها در اشرشیاکلی مهار

فعالیت آنزیم دهیدروژناز سلول‌ها بسیار ضعیف‌تر از تخریب ساختارهای بیوفیلمی بود و در دو باکتری دیگر عکس این پدیده مشاهده گردید. بر خلاف این مشاهدات، قابلیت عصاره‌های اکالیپتوس در مهار فعالیت متابولیکی باکتری استرپتوکوکوس پنومونیه بسیار بالا بود و با وجود تخریب بیش از ۵۰ درصد بیوفیلم‌های باکتری مذکور، اثربخشی بسیار ضعیفی در مهار پدیده تشکیل بیوفیلم نشان داد. در ارتباط با باکتری‌های باسیلوس سرئوس و پسودوموناس آئروژینوزا، قابلیت عصاره‌های اکالیپتوس در مهار تشکیل بیوفیلم و تخریب ساختارهای مذکور تفاوت چندانی نداشت. قدرت مهار آنزیم دهیدروژناز باسیلوس سرئوس در تیمار با عصاره بیشتر و در ارتباط با پسودوموناس آئروژینوزا کمتر از قابلیت مهار تشکیل بیوفیلم و یا تخریب این ساختار بود. از آن‌جا که مکانیسم‌های دخیل در تشکیل و گسترش بیوفیلم‌های هر یک از باکتری‌های مورد مطالعه متفاوت است، مکانیسم‌های مهاری متفاوتی نیز از عصاره‌های گیاه اکالیپتوس برای هر باکتری انتظار می‌رود. برای مثال عصاره‌های مذکور ممکن است حاوی ترکیبات مؤثری باشند که با فرایند تشکیل بیوفیلم به خوبی تداخل نماید، اما قدرت تخریبی کمی بر این ساختارها داشته باشد. با توجه به این‌که ترکیبات مؤثره عصاره‌های اکالیپتوس و مکانیسم اثر مهاری آن‌ها بر ساختارهای بیوفیلمی در مطالعه حاضر بررسی نگردید، می‌توان با شناسایی عناصر مذکور و با توجه به مولکول‌های کلیدی متفاوت که در فرایند تشکیل بیوفیلم باکتری‌های مورد مطالعه دخیل هستند، اختلافات مشاهده شده را تحلیل نمود.

در سایر بررسی‌ها نیز به خواص ضد میکروبی عصاره‌های اکالیپتوس بر بیماری‌زاهای مختلف اشاره شده است. برای مثال مشخص شد که عصاره‌های استونی اکالیپتوس در مهار عوامل بیماری‌زا مانند استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیاکلی، کلبسیلا پنومونیه و سالمونلا تیفی کارامدتر از انواع اتانولی و آبی می باشند و همچنین افزایش pH طی فرایند عصاره گیری موجب افزایش چشمگیر خاصیت مهاری عصاره می شود (۱۱). در مطالعات دیگر خواص ضد میکروبی گونه های مختلف گیاه اکالیپتوس تأیید گردیده که این بررسی‌ها بیشتر بر فرم منفرد باکتری‌ها انجام شده و به ساختارهای بیوفیلمی توجه کمتری شده است. برای مثال مشخص گردید که عصاره اتانولی گونه E. gluboles قابلیت مهار سویه‌های مختلف پسودوموناس آئروژینوزا را دارد (۲۱)؛ در حالی که قادر به مهار استرپتوکوکوس موتانس و سویه‌های لاکتوباسیلوس نیست (۲۲). در بررسی دیگری گزارش شد عصاره‌های هیدروالکلی E. tereticornis که به روش سوکسله تهیه می‌شوند، اثر مهاری مناسبی بر فرم منفرد باکتری‌های باسیلوس سرئوس، باسیلوس تورانژنسیس و پسودوموناس آئروژینوزا دارند. قابلیت مهاری عصاره‌های مذکور با افزایش غلظت، افزایش می‌یابد (۲۳).

در پژوهش‌های اندکی نیز خاصیت ضد بیوفیلمی اجزای مختلف گیاه اکالیپتوس تأیید شده است. برای مثال قابلیت روغن‌های فرار استخراج شده از گیاه اکالیپتوس در مهار ساختارهای بیوفیلمی کاندیدا آلبیکنس ثابت شده و جزء اصلی این ترکیبات که با خاصیت مهاری مرتبط است، ۱ و ۸- سینوله می‌باشد (۲۴). در بررسی دیگری مشخص شد که روغن‌های مذکور در حذف سریع و مهار بیوفیلم باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیاکلی و کاندیدا آلبیکنس بسیار مؤثر هستند (۲۵) که این یافته‌ها با نتایج پژوهش حاضر همخوانی دارد. همچنین روغن‌های فرار اکالیپتوس موجب مهار بیوفیلم استافیلوکوکوس اپیدرمیس می گردد و چنانچه با روغن‌های فرار گیاه آویشن ترکیب شود، اثر مهاری آن تا چند برابر افزایش می‌یابد (۲۶). پژوهش دیگری نشان داد چنانچه سطح استیل ضد زنگ به مدت ۱۰ دقیقه در تماس با روغن‌های فرار گیاه اکالیپتوس قرار گیرد، به طور معنی‌داری موجب کاهش بیوفیلم‌های این سطح خواهد شد (۲۷).

با توجه به نتایج حاصل از پژوهش حاضر و مطالعات انجام شده بر روی گونه‌های مختلف گیاه اکالیپتوس، پتانسیل ضد میکروبی این گیاه تأیید شد و عصاره‌های آن گزینه‌های مناسبی در مهار میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا می‌باشد. از آن جا که در تحقیق حاضر عصاره‌های الکلی اکالیپتوس اثر مهاری مناسبی بر فرم منفرد و ساختارهای بیوفیلمی باکتری‌های مورد مطالعه در شرایط آزمایشگاهی نشان دادند، می‌توان با بررسی و تخلیص ترکیبات مؤثره این عصاره‌ها و همچنین ارزیابی اثربخشی عصاره‌های مذکور در حیوانات آزمایشگاهی و پس از استانداردسازی فارماکولوژیک، از آن‌ها به عنوان یک منبع ضد میکروبی مناسب در مقابله با میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا به ویژه در شکل بیوفیلمی بهره گرفت.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید باهنر کرمان به‌دلیل حمایت مالی این پایان نامه تشکر و قدردانی می‌کنند.

References

1. 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.
2. Kuzma L, Rozalski M, Walencka E, Rozalska B, Wysokinska H. Antimicrobial activity of diterpenoids from hairy roots of Salvia sclarea L.: salvipisone as a potential anti-biofilm agent active against antibiotic resistant Staphylococci. *Phytomedicine* 2007; 14(1): 31-5.
3. Myszka K, Czaczyk K. Bacterial Biofilms on Food Contact Surfaces - a Review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* 2011; 61(3): 173-80.
4. Taylor PW. Alternative natural sources for a new generation of antibacterial agents. *Int J Antimicrob Agents* 2013; 42(3): 195-201.
5. Schlag S, Nerz C, Birkenstock TA, Altenberend F, Gotz F. Inhibition of staphylococcal biofilm formation by nitrite. *J Bacteriol* 2007; 189(21): 7911-9.
6. Kavanaugh NL, Ribbeck K. Selected antimicrobial essential oils eradicate Pseudomonas spp. and Staphylococcus aureus biofilms. *Appl Environ Microbiol* 2012; 78(11): 4057-61.
7. Das K, Tiwari RKS, Shrivastava DK. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agents: Current methods and future trends. *Journal of Medicinal Plants Research* 2010; 4(2): 104-11.
8. Emami A, Ahi A. Pharmacological plant biology. Mashhad, Iran: Mashhad Universityo f Medical Sciences; 2012. p. 278-413. [In Persian].
9. Mohammed Hassan KA, Eltayb N. Eucalyptus Oil as a Treatment for Acne. *Int J Adv Pharmac Sci* 2013; 4(4): 557-66.
10. Al-Muhna BM. Study of the inhibitory effect of *Thymus vulgaris* and *Eucalyptus camaldulensis* on in vitro growth of *Listeria monocytogenes*. *Kufa J Veterin Med Sci* 2010; 1(1): 18-27.
11. Abubakar M. Antibacterial potential of crude leaf extracts of Eucalyptus camaldulensis against some pathogenic bacteria. *African Journal of Plant Science* 2010; 4(6): 202-9.
12. 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. 9th ed. Amsterdam, The Netherlands: Mosby; 1994. p. 171-94.

13. Andrews JM, Howe RA. BSAC standardized disc susceptibility testing method (version 10). *J Antimicrob Chemother* 2011; 66(12): 2726-57.

14. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 1966; 45(4): 493-6.

15. Dey PM, Harborne JB. Methods in plant biochemistry: screening medthods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. London, UK: Academic Press; 1991.

16. Cramton SE, Gerke C, Gotz F. In vitro methods to study staphylococcal biofilm formation. *Methods Enzymol* 2001; 336: 239-55.

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

18. Mahdavi M, Kasra Kermanshahi R, Jalali M. The assessment of disinfectants on various bacterial biofilms. *Research Journal of University of Isfahan* 2006; 31(2): 35-46. [In Persian].

19. (Sandasi M. The effect of plant extraction on microbial biofilm formation and development [Thesis]. Staatsartillerie Rd, South Africa: Tshwane University of Technology; 2008.

20. Ramage G, Lopez-Ribot JL. Techniques for antifungal susceptibility testing of Candida albicans biofilms. *Methods Mol Med* 2005; 118: 71-9.

21. Kamel GM, Ezz eldeen NA, El-Mishad MY, Farouk Ezzat R. Susceptibility pattern of *Pseudomonas aeruginosa* against antimicrobial agents and some plant extracts with focus on its prevalence in different sources. *Global Veterinaria* 2011; 6(1): 61-72.

22. Ahmadi Motamayel F, Hassanpour S, Alikhani MY, Poorolajal J, Salehi J. Antibacterial effect of eucalyptus *(Labill glubulus*) and garlic (*Allium sativum*) extracts on oral cariogenic bacteria. *Journal of Microbiology Researchand Reviews* 2013; 1(2): 12-7. [In Persian].

23. Badrunnisa S, Ramanath Pai V, Shantaram M. Antibacterial activity of *Eucalyptus tereticornis* extracts for in use coolants of steel industry. *Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences* 2011; 2(4): 1789-94.

24. Bink A, Pellens K, Cammue BP, Thevissen K. Anti-biofilm strategies: How to eradicate *Candida* biofilms? *The Open Mycology Journal* 2011; 5: 29-38.

25. Wijman JG, de Leeuw PP, Moezelaar R, Zwietering MH, Abee T. Air-liquid interface biofilms of Bacillus cereus: formation, sporulation, and dispersion. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73(5): 1481-8.

26. Karpanen TJ, Worthington T, Hendry ER, Conway BR, Lambert PA. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine digluconate alone and in combination with eucalyptus oil, tea tree oil and thymol against planktonic and biofilm cultures of Staphylococcus epidermidis. *J Antimicrob Chemother* 2008; 62(5): 1031-6.

27. Hendry E, Conway B, Worthington T. Digluconate and isopropyl alcohol biocide formulation. *Int J Mol Sci* 2012; 13(11): 14016-25.

Investigations of Antimicrobial Activity of Eucalyptus Camaldulensis Extracts against Six Pathogenic Bacteria in Planktonic Form and Biofilm

Zeynab Mohsenipour, M.Sc.[1], Mehdi Hassanshahian, Ph.D.[2*], Mohammad Moradi Ph.D.[3]

1. Department of Biology, School of Science, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

2. Assistant Professor, Department of Biology, School of Science, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

3. Assistant Professor, Department of Microbiology, Afzalipour School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

* Corresponding author; e-mail: mshahi@uk.ac.ir

(Received: 21 Dec. 2013 Accepted: 18 June 2014)

Abstract

Background & Aims: Microorganisms are protected from antimicrobial agents when placed in biofilm structure. Biofilm-producing microorganisms are responsible for many problems in industry and medicine; therefore, it is essential to find new techniques for removing and inhibiting biofilms. This study aimed to examine the antimicrobial effect of Eucalyptus camaldulensis alcoholic extracts against planktonic form and biofilm of six bacteria including Staphylococcusaureus aureus, Bacillus cereus, Streptococcus pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, and Klebsiella pneumoniae.

Methods: Antimicrobial activities of the plant extracts against the planktonic form of bacteria were evaluated using disc diffusion method. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) values were determined using a macrobroth dilution technique. Anti-biofilm effects were assessed using microtiter plate method.

Results: The results of this study confirmed the strong ability of E. camaldulensis extracts against the biofilm of tested bacteria and their free-living forms. Ethanolic extracts were more effective in inhibiting planktonic bacterial growth than methanolic extracts. Anti-biofilm effects of plant extracts were associated with the solvent and extract concentration. Eucalyptus camaldulensis methanol extract of 20 mg/ml concentration was the most efficient in the inhibition of biofilm formation of Staphylococcus aureus (84.42%). These extracts had the ability to remove more than 50% of stabilized biofilms. In Klebsiella pneumonia, however, only a 29.20% eradication of biofilms was observed. The highest decrease in methabolic activity was observed in Streptococcus pneumoniae biofilms (82.13%) treated with 20 mg/ml ethanolic extract.

Conclusion: In this study, the antimicrobial activity of Eucalyptus camaldulensis extracts against the selected microorganisms was demonstrated. Thus, these extracts are recommended as a suitable option against the selected isolates.

Keywords: Biofilm, Eucalyptus camaldulensis, Drug resistant, Antimicrobial effect

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2015; 22(2): 172-184