

مطالعه‌ی مولکولی بیان ژن بیوفیلم *icaD* تحت اثر عصاره گیاهان زنجیل و کنگر فرنگی

در باکتری *Staphylococcus aureus*

* متین قدرت^۱، هادی حبیب‌الهی^۲ و محمد رضا صفری مطلق^۲



^۱ ایران، رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد رشت، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی

^۲ ایران، رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد رشت، دانشکده علوم کشاورزی، گروه گیاه‌پزشکی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۶/۲۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۶/۱۳

چکیده

بیوفیلم تجمعی از باکتری‌ها می‌باشد که باعث افزایش اتصال به سطوح بیولوژیکی و غیربیولوژیکی شده و در باکتری باعث ایجاد بیماری‌زایی و عفونت می‌گردد. ژن‌های اپرونی *icaABCD* در این امر دخالت دارند. ژن *icaD* نقش مهمی در حداکثر بیان آنزیم N – استیل گلوکرآمین ترانسферاز دارد و منجر به بیان فوتیپیک پلی‌ساقارید خارج سلولی در *S. aureus* می‌شود. گیاهان دارویی بسیاری دارای خاصیت ضد باکتریایی هستند. در این تحقیق، تأثیر ضد میکروبی عصاره زنجیل و کنگر فرنگی روی دو سویه از باکتری *S. aureus* بر اساس تست آنتی‌بیوگرام مطالعه گردید. همچنین پس از آزمون‌های پایین‌ترین غلظت مهارکنندگی (MIC) و پایین‌ترین غلظت باکتری‌کشی (MBC)، با استفاده از تکنیک Real time PCR، میزان بیان ژن بیوفیلم *icaD* تحت تیمار عصاره کنگر فرنگی و عصاره زنجیل در سویه‌های مورد مطالعه ارزیابی شد. نتایج حاصل از آزمون انتشار از دیسک نشان داد که غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره زنجیل و نیز کنگر فرنگی در سویه استاندارد و پاتوژن *S. aureus*، به ترتیب هاله عدم رشد ۱۵ میلی‌متری و حدود ۹ میلی‌متری ایجاد می‌کند. آزمون MIC نیز نشان داد که سویه‌های مورد مطالعه در غلظت ۵۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره‌های گیاهی نیز توان رشد دارند. نتایج حاصل از بررسی میزان بیان ژن *icaD* تحت تأثیر عصاره‌های کنگر فرنگی و زنجیل در سویه استاندارد بیانگر افزایش بیان این ژن بود ولی در سویه پاتوژن *S. aureus*، عصاره‌های زنجیل و کنگر فرنگی با اختلاف معنی دار $P < 0.01$ به ترتیب منجر به کاهش قابل توجه بیان ژن *icaD* به حدود ۲۸ درصد و ۱۰ درصد نمونه کنترل شدند.

واژه‌های کلیدی: بیوفیلم، *Staphylococcus aureus*، ژن *icaD*، زنجیل، کنگر فرنگی.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۱۳۸۴۱۶۸، پست الکترونیکی: ssafarimotlagh@yahoo.com

مقدمه

این باکتری با شرایط مختلف محیطی و مقاومت زیاد در برابر خشکی و با فشارهای اسمزی می‌باشد (۱۴). به علت پیدایش سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در باکتری *S. aureus* برخی از سویه‌ها حتی نسبت به تعداد زیادی از ترکیبات ضد میکروبی اعم از آنتی‌بیوتیک‌ها و ضد عفونی-کننده‌ها، مقاومت نشان داده‌اند (۲۷). سویه‌هایی از *S. aureus* که این مواد را تولید می‌کنند، طرفیت کلونیزاسیون بالایی نسبت به سویه‌هایی که این دو عامل را تولید نمی-

یکی از پاتوژن‌های مهم و شایع *Staphylococcus aureus* عفونت‌های بیمارستانی است که با داشتن آنژیم‌های مختلف قادر است در همه جای بدن عفونت ایجاد کند. این باکتری از نظر ایجاد عفونت‌های بیمارستانی در مرتبه دوم پس از *Pseudomonas aeruginosa* قرار دارد (۳۴). این باکتری قابلیت زنده ماندن در بدن و محیط‌های خارج از بدن میزبان طبیعی خود مانند هوا، گرد و خاک و آب را دارد و این توانایی به دلیل انطباق و سازگاری بسیار زیاد

زای میکروبی، استفاده از مواد طبیعی به عنوان ترکیبات ضد میکروبی می‌تواند روشی مؤثر برای کنترل باکتری‌های بیماری‌زا باشد (۳). استفاده بی‌رویه و بدون تجویز پرشک از آنتی‌بیوتیک‌ها، مقاومت‌های رویه گسترش میکرووارگانیسم-ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج درمانی، عوارض نامطلوب و جانبی ناشی از استفاده آنها و از طرفی مقرنون به صرفه‌نوبن ساخت برخی داروهای شیمیابی باعث سوچ صنعت داروسازی به گیاهان دارویی شده است تا دوباره توجه جوامع پزشکی و محققین به پزشکی سنتی، فیتوترالپی و مواد مؤثره موجود در گیاهان دارویی (فنل، فلاونوئیدها، فلاون، ترپن‌ها و ...) معطوف گردد (۲۹). عصاره گیاهان دارویی مختلفی همچون زردچوبه برای درمان سرطان کولون (۲) به کار رفته‌اند. همچنین فعالیت ضد باکتری‌ای عصاره هیدروالکلی گیاهان آویشن و بهیمو علیه باکتری *Pseudomonas syringae* در شرایط آزمایشگاهی به اثبات رسیده است (۱).

زنجبیل از قدیم برای درمان عفونت‌های نای و مهار طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها از قبیل باکتری‌های گرم مثبت، گرم منفی و قارچ‌ها استفاده می‌شده است. مطالعات متعددی نقش ضد میکروبی این گیاه در مقابل باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی را نشان داده‌اند (۲۷). کنگرفرنگی در منابع مختلف به عنوان گیاهی دارویی معرفی شده و فرآورده‌های حاصل از آنها در پیشگیری و درمان بسیاری از بیماری‌های ناشی از قارچ‌ها و باکتری‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲۰).

مطالعات انجام‌شده اثرات ضد باکتری‌ای پیاز و زنجبیل روی باکتری‌های *Bacillus subtilis*، *Escherichia coli* و *Salmonella typhimurium* را به اثبات رسانده‌اند. نتایج نشان داد که زنجبیل حاوی مواد ضد میکروبی فلاونوئیدی است (۲۳). بررسی خاصیت ضد باکتری‌ای عصاره خام آبی و الکلی پیاز و زنجبیل در برابر *S. aureus*، *Candida albicans* و *E. coli aeruginosa* جدا شده از

کنند دارند که این امر منجر به مقاومت بالا نسبت به درمان با آنتی‌بیوتیک‌ها می‌شود (۱۹).

بیوفیلم را می‌توان یک اجتماع باکتری‌ای نامید که در آن باکتری‌ها به یک سطح زنده و یا غیرزنده اتصال داشته و در یک لایه خارج‌سلولی محصور شده‌اند (۹). ماهیت آب-گریزی سطح خارجی باکتری در اتصال غیراختصاصی آن به سطوح پلاستیکی، اتصال به فاگوسیت‌ها و دیگر سلول‌های پستانداران و نیز در رشد سلول‌ها روی لایه‌های نامحلول آب‌گریز مثل هیدروکربن‌ها اهمیت دارد (۶، ۳۰ و ۳۱). تشکیل بیوفیلم می‌تواند باعث ایجاد مشکلاتی در زمینه پزشکی از جمله عفونت وسایل خارجی مانند کاترها، لوله‌های حلقی و لنزهای تماسی و نیز عفونت بافت‌های زنده مانند عفونت اندوکارد، عفونت زخم و عفونت اپی‌تالیوم ریه مخصوصاً در بیماران مبتلا به فیبروز کیستی شود (۳۵). تولید بیوفیلم ناشی از فعالیت اپرانی تحت عنوان *icaABCD* می‌باشد که مهم‌ترین عامل برای تشکیل ماتریکس اگزوپلی‌ساقاریدی است که از عوامل چسبندگی بین سلولی بوده و پروتئین‌های عوامل اتصالی بین سلولی *icaD*, *icaC*, *icaB*, *icaA* در تولید آن دخالت دارند (۱۲، ۲۲ و ۳۲). این پلی‌ساقارید پلیمری از واحدهای گلیکوز آمینو‌گلیکان می‌باشد که توسط آنزیم آستیل گلوکز آمینیل ترانسفراز سنتز می‌شود. بیان این آنزیم توسط لوکوس‌های *ica* انجام می‌شود (۴). از میان ژن‌های لوکوس *ica* (Intracellular adhesin) *ica* در *S. aureus* موجب افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی و بیماری‌زایی می‌شود (۱۰).

محرك‌های ایمنی عواملی هستند که با هدف قرار دادن ایمنی غیراختصاصی موجود سبب افزایش مقاومت میزبان در برابر بیماری می‌شوند (۲۸). یکی از محرك‌های ایمنی موثر و قوی، گیاهان و ترکیبات آنها هستند که می‌توانند جایگزین داروهای شیمیابی شوند (۳۳). به‌منظور کاهش زیان‌های اقتصادی و خطرات جانی ناشی از عوامل بیماری-

آزمایش گردید و نتایج نشان داد که این عصاره بر *V. alginolyticus* بیشترین اثر ضد باکتریایی را دارد (۷).

بررسی خواص ضد میکروبی ضایعات کارخانه کنسرو کنگر فرنگی نشان داد که حداکثر فعالیت ضد میکروبی در عصاره متانولی فتل‌های متصل (برگچه‌ها و گل‌ها) علیه باکتری‌های گرم منفی به دست می‌آید (۱۱).

خسروی درانی و همکاران (۱۷) در بررسی خاصیت ضد میکروبی سه نوع عسل در ایران به همراه عصاره الکلی *S. aureus*، آویشن و نیز عصاره و نشاسته زنجیبل در *C. albicans* و *E. coli*، *Pseudomonas aeruginosa* این نتیجه رسیدند که اثر مهاری عصاره آویشن بر باکتری‌ها بیشتر از قارچ کاندیدا بود و عصاره زنجیبل به طور معنی‌داری بیشتر از مواد دیگر در مهار رشد باکتری‌ها موثر بود.

هدف از این تحقیق مطالعه‌ی مولکولی بیان ژن بیوفیلم تحت اثر عصاره گیاهان زنجیبل و کنگر فرنگی در باکتری *S. aureus* *icaD* بود.

مواد و روشها

تهیه عصاره گیاهان: کپسول ۴۰۰ میلی‌گرمی گیاه کنگر فرنگی با نام تیشوک (Tichoke capsule) و کپسول ۲۵۰ میلی‌گرمی عصاره خشک ریشه گیاه زنجیبل با نام زیتوما (Zintoma capsule) از شرکت داروسازی گل دارو تهیه گردید. هر کپسول زیتوما محتوی ۲۵۰ میلی‌گرم گرانول پودر ریزوم زنجیبل بود که معادل با ۲/۵ میلی‌گرم اسانس در هر کپسول است. مواد مؤثره این عصاره شامل جین‌جرول و شوگال و گلیکوزیدها شامل آماروپانین، اناروزورین می‌باشد. هر کپسول تیشوک نیز حاوی ۴۰۰ میلی‌گرم عصاره خشک کنگر فرنگی (*Cynara scolymu*) مشتمل بر ۲۰-۱۴ میلی‌گرم ماده مؤثره کلروژنیک اسید بود. از هر یک از مواد مذکور، محلول‌های آبی استرک ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تهیه گردید.

ادرار، نشان داد که عصاره الکلی زنجیبل بیشترین اثر مهارکنندگی رشد میکروبی را دارا بود (۲۱).

در مطالعه‌ای اثر عصاره برگ گیاه کنگر فرنگی در برابر باکتری‌های *S. aureus*، *Bacillus subtilis*، *E. Micrococcus luteus*، *Agrobacterium tumefaciens*، *P. aeruginosa* و *S. typhimurium*، *C. coli* و *C. albicans*

S. cerevisiae و *Saccharomyces dositaniae*، *Aspergillus niger*، *carlsbergensis* قارچ‌های و *Mucor mucedo*، *Penicillium oxalicum* مورد بررسی قرار گرفت و *Cladosporium cucumerinum* اثرات ضد میکروبی آنها به اثبات رسید (۳۷).

در مطالعه دیگری خاصیت ضد باکتریایی و اثر ضد چسبندگی ۲۵ گونه گیاه روی باکتری *Helicobacter pylori* بررسی گردید که از میان آنها زیره سبز، زیره سیاه، زنجیبل، چیلی، شیرین بیان، گل گاو زبان و پونه کوهی اثر قطعی ضدباکتریایی نشان دادند (۲۶). اضافه کردن عصاره کنگر فرنگی به محیط برخی از باکتری‌های گونه سودوموناس که به پنی سیلین G و اریتروماسین مقاوم بودند، سبب توقف رشد باکتری‌ها گردید (۸). در بررسی خواص ضد باکتریایی انسان‌های گیاهان خانواده Zingiberaceae گیاه زنجیبل بیشترین کارآیی را در بازدارندگی باکتری‌های *S. aureus*، *Bacillus cereus* و *Listeria monocytogenes* داشت (۲۵).

در بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره اتانولی، کلروفرمی و پترولیوم اتری زنجیبل بر ۱۳ نوع باکتری و سه نوع قارچ با استفاده از روش دیسک دیفیوژن، حلal اتانولی زنجیبل بیشترین تاثیر فعالیت عصاره روی قارچ‌ها و باکتری‌ها به ویژه *Vibrio parahemolyticus* را نشان داد (۱۶).

در تحقیقی اثر عصاره زنجیبل روی دو گونه از باکتری‌های *V. parahemolyticus* و *Vibrio alginolyticus* گرم منفی

انتقال یافت و عملیات رقیق‌سازی سریالی انجام شد. لوله‌های شماره ۹ و ۱۰ نیز به ترتیب به عنوان کنترل منفی و مثبت در نظر گرفته شدند. به غیر از لوله کنترل منفی به بقیه لوله‌ها ۲۰۰ میکرولیتر از محیط براث حاوی باکتری با کدورت معادل نیم مک فارلند اضافه گردید و در نهایت این لوله‌ها در انکوباتور به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند. از ۳۰ لوله آزمایش، ۱۰ لوله برای عصاره گیاه زنجیبل، ۱۰ لوله برای عصاره گیاه کنگر فرنگی و در نهایت ۱۰ لوله برای ترکیبی از عصاره‌های هر دو گیاه در نظر گرفته شد. این مراحل برای دو سویه باکتری *S. aureus* در نظر گرفته شد.

آزمون حداقل غلظت کشندگی Minimum Bacterial Concentration (MBC): بعد از ۲۴ ساعت از آزمون MIC، آزمون MBC انجام شد. در این آزمایش از نمونه‌های لوله‌های شماره ۱ تا ۸ استفاده گردید. این نمونه‌ها در هشت پلیت جداگانه حاوی محیط کشت مولر هیبتون آگار به صورت چمنی و یک‌دست کشت داده شدند و بعد از آن به مدت ۲۴ ساعت پلیت‌ها از لحظه رشد باکتری مورد بررسی قرار گرفتند.

استخراج DNA: برای استخراج DNA از دو سویه مورد مطالعه رشدیافته در محیط مولر هیبتون براث استفاده گردید. مراحل کار با استفاده از کیت استخراج DNA باکتری‌های گرم مثبت شرکت پیشگامان و طبق دستورالعمل این کیت انجام گرفت.

بررسی وجود ژن *icaD* در سویه‌های مورد مطالعه: برای این منظور با استفاده از آغازگرهای اختصاصی از روش PCR استفاده گردید. توالی‌های جفت آغازگر مورد نظر در جدول ۱ آمده است (۵).

جدول ۱- توالی‌های آغازگرهای مورد مطالعه

نام آغازگر	توالی
------------	-------

کشت و جداسازی باکتری *S. aureus* مورد مطالعه: کشت باکتری *S. aureus* از دو سویه استاندارد (ATCC 25923) و سویه نمونه‌گیری شده از پاتوژن به صورت کشت چمنی روی محیط کشت مولر هیبتون آگار روی پلیت انجام گرفت. پلیت‌های حاوی باکتری در انکوباتور به مدت ۲۴ ساعت نگهداری و سپس در محیط مولر هیبتون براث کشت داده شدند. ۲۴ ساعت پس از کشت، کدورتی معادل محیط نیم مک فارلند آمده گردید.

آزمون اثر ضد میکروبی عصاره‌ها: برای این منظور از دیسک‌های بلانک استفاده گردید. هر دیسک بلانک در ۵۰ میکرولیتر از عصاره گیاهی با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر زنجیبل و کنگر فرنگی به طور جداگانه آغشته شد و در محیط کشت مولر هیبتون آگار حاوی باکتری، دیسک‌گذاری انجام گردید. علاوه بر این از ترکیب ۱۰۰ میلی‌گرم عصاره‌های زنجیبل و کنگر فرنگی با نسبت مساوی ۱:۱ نیز برای آغشته‌سازی و دیسک‌گذاری استفاده شد. سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و قطر هاله عدم رشد اندازه‌گیری گردید.

آزمون حداقل غلظت مهاری Minimum Inhibitory Concentration (MIC): آزمون میکروبی MIC از عصاره گیاهی با استفاده از محیط مولر هیبتون براث انجام شد. برای تهیه مولر هیبتون براث، ۲/۱ گرم از پودر براث به ۱ لیتر آب مقطر انتقال یافت و بعد از حل شدن کامل با هیتر مغناطیسی به مقدار ۲ میلی‌لیتر در هر یک از ۳۰ لوله آزمایش ریخته و اتوکلاو شد. سپس در لوله شماره ۱، به میزان ۲ میلی‌لیتر از عصاره ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر (۱۰۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) گیاه مورد نظر (زنجبیل یا کنگر فرنگی) ریخته شد که در این حالت غلظت ۵۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای لوله شماره یک ایجاد گردید. ۲ میلی‌لیتر از لوله شماره ۱ به لوله شماره ۲، ۲ میلی‌لیتر از لوله شماره ۲ به لوله شماره ۳ و به ترتیب تا لوله شماره ۸

ارزیابی گردید. Transilluminator، باندهای محصول PCR رؤیت و

جدول ۲- مواد واکنش گر مورد استفاده در PCR ژن *icaD*

واکنش گر	حجم (میکرولیتر)
آب مقطر	15.5
PCR بافر (10X)	2.5
MgCl ₂ (10mM)	1.5
dNTPs (10mM)	1
آغازگر مستقیم (10p.mol)	0.5
آغازگر معکوس (10p.mol)	0.5
الگو DNA	3
Taq polymerase (100U/ μ L)	0.5
حجم کل	25

Icad-F ACCCAACGCTAAAATCATCG
Icad-R GCGAAAATGCCCATAGTTTC

واکنش PCR ژن *icaD* با استفاده از مواد واکنش گر و برنامه دمایی که به ترتیب در جداول ۲ و ۳ آمده است، صورت گرفت.

ارزیابی محصول PCR: برای این منظور، الکتروفورز انجام شد. با استفاده از بافر TBE و پودر آگارز، ژل آگارز ۱٪ تهیه گردید و ۵ میکرولیتر از محصول PCR با پاورلود مخلوط و به درون چاهک‌ها تزریق شد. در یک چاهک نیز DNA Ladder 100 bp تزریق شد. پس از الکتروفورز در ولتاژ ۱۵۰ ولت، با قرار دادن ژل بر روی دستگاه UV

جدول ۳- شرایط بهینه دمایی PCR ژن *icaD*

برنامه	زمان	دما
واسرشت اولیه	۵ دقیقه	۹۴°C
واسرشت	۴۵ ثانیه	۹۴°C
دمای اتصال آغازگر	۶۰ ثانیه	۵۹°C
گسترش آغازگر	۴۵ ثانیه	۷۲°C
گسترش نهایی	۵ دقیقه	۷۲°C
		۳۵ سیکل

و محصول این ستر به‌منظور بررسی میزان بیان ژن *icaD* تحت تأثیر عصاره زنجبل و کنگر فرنگی در هر دو سویه مورد نظر برای ریل تایم به کار گرفته شد. در این روش از ژن *16S rRNA* به عنوان ژن مرجع استفاده گردید.

واکنش PCR : برای این منظور ۱۰ میکرولیتر SYBR Green Premix به هر میکروتیوب اضافه گردید. سپس ۱ میکرولیتر از آغازگر مستقیم و معکوس، ۲ میکرولیتر از محلول cDNA و نیز ۴ میکرولیتر ROX Reference Dye به میکروتیوب‌ها افزوده شد. برای رسیدن به حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر، ۶ میکرولیتر آب فاقد نوکلئاز اضافه و مخلوط گردید و ۱۸ میکرولیتر از این مخلوط به میکروتیوب‌های استریپ اضافه شد. آنالیز نسبی در سطح

استخراج RNA: بر اساس نتایج حاصل از MIC و MBC حداقل غلظت عصاره‌های زنجبل و کنگر فرنگی که باعث مهار و کشتن سویه‌های باکتریایی نمی‌شدند برای تیمار دو سویه مورد نظر در محیط براث باکتریایی معادل نیم مک فارلند استفاده گردید و پس از انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، استخراج RNA با استفاده از تراپیزول شرکت ROJETechnologies، طبق دستورالعمل کیت و با رعایت شرایط استریل و در دمای پایین انجام شد.

ستز cDNA: با استفاده از RNA‌های استخراج شده و با استفاده از کیت ستز شرکت Parstous biotechnology و طبق پروتکل این کیت، ستز cDNA انجام شد. ستز cDNA با استفاده از آغازگرهای تصادفی هگزامر انجام شد

توالی آغازگرهای مربوط به ژن‌های *icaD* و *16SrRNA* را نشان می‌دهد (۵).

mRNA با سه تکرار انجام شد و برای تجزیه و تحلیل نتایج ریل تایم PCR از روش Pfaffian با $e^{-\Delta\Delta CT}$ و با مقایسه با ژن مرجع *16SrRNA* استفاده گردید. جدول ۴

جدول ۴- آغازگرهای مورد استفاده ژن مرجع *16SrRNA* و ژن *icaD* (۳)

آغازگر	توالی	اندازه محصول
<i>icaD-F</i>	ACCCAACGCTAAAATCATCG	۲۱۱ bp
<i>icaD-R</i>	GCGAAAATGCCCATAGTTTC	
<i>16SrRNA-F</i>	GGGACCCGCACAAGCGGTGG	۱۹۱ bp
<i>16SrRNA-R</i>	GGGTTGCGCTCGTGCAGGGAA	

عصاره‌های گیاهان زنجیبل و کنگر فرنگی و نیز ترکیبی از هردو عصاره برای هر دو سویه استاندارد و پاتوژن باکتری *S. aureus* با دو تکرار به کار رفت. قطر هاله عدم رشد در جدول ۵ نشان داده شده است.

نتایج

اثر ضد میکروبی عصاره‌های گیاهی زنجیبل و کنگر فرنگی: برای انجام این آزمایش، روش دیسک گذاری و آغشته‌سازی دیسک‌ها با محلول ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر

جدول ۵- قطر هاله عدم رشد سویه‌های مورد مطالعه باکتری تحت تیمار به روش دیسک گذاری

قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر)	نوع سویه	<i>S. aureus</i>	نوع سویه	نوع سویه
۱۵	زنجبیل	زنجبیل	سویه استاندارد	
۱۵	کنگر فرنگی	کنگر فرنگی		
۱۵	ترکیبی از هر دو گیاه	ترکیبی از هر دو گیاه		
۹	زنجبیل	زنجبیل	سویه پاتوژن	
۸	کنگر فرنگی	کنگر فرنگی		
۰	ترکیبی از هر دو گیاه	ترکیبی از هر دو گیاه		

بررسی وجود ژن *icaD*: به منظور اثبات وجود ژن *icaD* در سویه‌های *S. aureus* مورد مطالعه، آغازگرهای اختصاصی این ژن مورد استفاده قرار گرفت و پس از انجام PCR در شرایط بهینه دمایی و زمانی مطلوب، باندی در محدوده ۲۱۰ جفت بازی که مطابق با مقاله (Atshan et al., 2012) بود، حاصل گردید.

آزمون MIC و MBC تحت تیمار عصاره‌های زنجیبل و کنگر فرنگی: با انجام این آزمون‌ها مشخص شد که هر دو سویه استاندارد و پاتوژن *S. aureus* مورد مطالعه در بالاترین غلظت به کار رفته از عصاره‌های زنجیبل و کنگر فرنگی یعنی غلظت ۵۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، توان رشد دارند. بنابراین نتایج، غلظت ۵۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره‌های زنجیبل و کنگر فرنگی برای بررسی بیان ژن *icaD* مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۱).



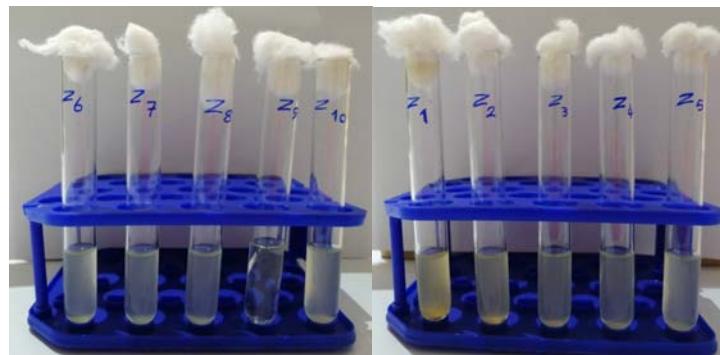
شکل ۱- (الف): سویه پاتوژن استافیلوکوکوس اورئوس + عصاره کنگر فرنگی (T)

لوله شماره ۱: غلظت ۵۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره، لوله شماره ۸: غلظت ۳۹ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره، لوله شماره ۹: کنترل منفی (عصاره کنگر فرنگی بدون باکتری) لوله شماره ۱۰: کنترل مثبت (باکتری بدون عصاره کنگر فرنگی)



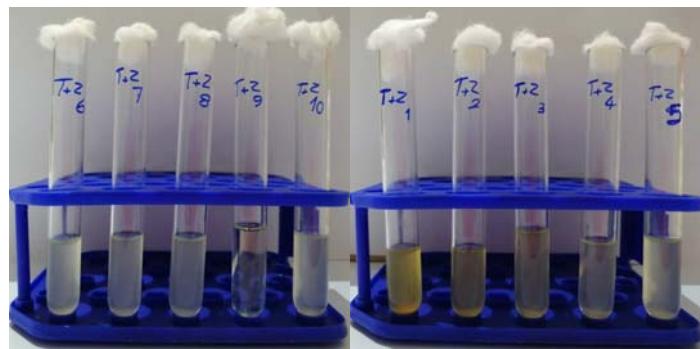
شکل ۱- (ب): سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس + کنگر فرنگی (T)

لوله شماره ۱: غلظت ۵۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره، لوله شماره ۸: غلظت ۳۹ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره، لوله شماره ۹: کنترل منفی (عصاره کنگر فرنگی بدون باکتری) لوله شماره ۱۰: کنترل مثبت (باکتری بدون عصاره کنگر فرنگی)



شکل ۱- (ج): سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس + زنجیل (Z)

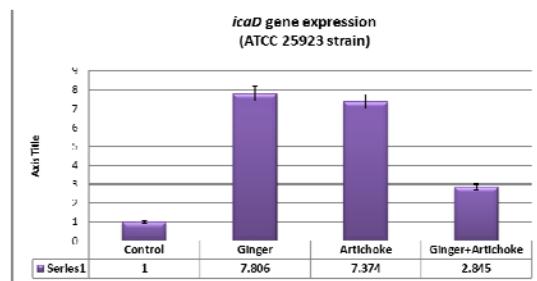
لوله شماره ۱: غلظت ۵۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره، لوله شماره ۸: غلظت ۳۹ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره، لوله شماره ۹: کنترل منفی (عصاره زنجیل بدون باکتری) لوله شماره ۱۰: کنترل مثبت (باکتری بدون عصاره زنجیل)



شکل ۱ - (د): سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس - کنگر فرنگی (T) + زنجیل (Z)

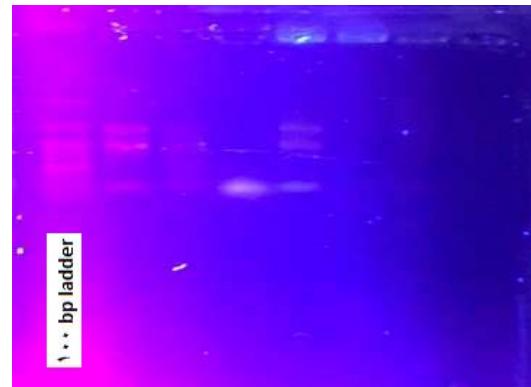
لوله شماره ۱: غلظت ۵۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر از ترکیب ۱:۱ هر دو عصاره، لوله شماره ۸: غلظت ۳۹ میکروگرم بر میلی لیتر ترکیب ۱:۱ هر دو عصاره، لوله شماره ۹: کنترل منفی (نسبت مساوی دو عصاره گیاه بدون باکتری) لوله شماره ۱۰: کنترل مثبت (باکتری بدون عصاره گیاه)

کنگر فرنگی باعث افزایش ۷/۳ برابری بیان این ژن بیوفیلم شد. استفاده همزمان از عصاره زنجیل و کنگر فرنگی، میزان بیان ژن بیوفیلم *icaD* را ۲/۸ برابر نمونه بدون تیمار افزایش داد (شکل ۳).

شکل ۳- اطلاعات حاصل از آنالیز نتایج ریل تایم سویه استاندارد *S. aureus*

بررسی بیان ژن *icaD* در سویه پاتوژن: بر اساس داده های حاصل از آنالیز نتایج ریل تایم، میزان بیان ژن *icaD* در سویه پاتوژن بین نمونه های تیمار شده با عصاره زنجیل، تیمار شده با کنگر فرنگی و تیمار توأم میزان بیان ژن *icaD* تحت تیمار عصاره زنجیل در این سویه، تا ۲۸ درصد نمونه کنترل کاهش نشان داد. بیان این ژن تحت تیمار عصاره کنگر فرنگی، کاهش ۹۰ درصدی نشان داد. به عبارت دیگر بیان این ژن به حدود ۱۰ درصد نمونه کنترل رسید. تیمار همزمان سویه پاتوژن باکتری *S. aureus* با عصاره های زنجیل و کنگر فرنگی، کاهش ۹۷ درصدی در بیان این ژن بیوفیلم نشان داد و بر

بررسی کیفیت استخراج RNA: پس از تیمار هر دو سویه استاندارد و پاتوژن *S. aureus* با غلظت ۵۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره زنجیل، کنگر فرنگی و تیمار توأم عصاره های زنجیل و کنگر فرنگی، RNA کل استخراج گردید. شکل ۲ کیفیت استخراج چند نمونه روی ژل آگارز را نشان می دهد.



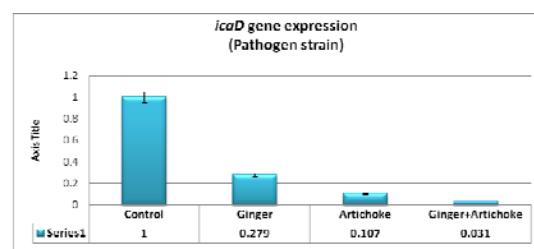
شکل ۲- باندهای حاصل از استخراج RNA

بررسی بیان ژن *icaD* در سویه استاندارد: مقایسه میزان بیان ژن *icaD* در سویه استاندارد بین نمونه های تیمار شده با عصاره زنجیل، تیمار شده با کنگر فرنگی و تیمار توأم عصاره زنجیل و کنگر فرنگی در نمودار حاصل از آنالیز نتایج ریل تایم نشان داد که تمام تیمارهای مورد نظر باعث افزایش بیان ژن بیوفیلم *icaD* در سویه استاندارد *S. aureus* گردید. تیمار سویه استاندارد با عصاره زنجیل منجر به افزایش بیان ژن *icaD* ۷/۸ برابری بیان ژن *icaD* و تیمار این باکتری با

در پژوهشی دیگر مشخص گردید که عصاره زنجیبل قادر است در محیط کشت *S. aureus* هاله عدم رشدی به قطر حدود ۱۲ - ۸ میلی‌متر ایجاد نماید (۱۵). همچنین فعالیت ضد باکتریایی عصاره الکلی زنجیبل و ایجاد هاله عدم رشد به قطر حدود ۱۴ - ۱۳ میلی‌متر در مطالعه یاسن و ابراهیم (۳۶) گزارش شده است. این مطالعات با تحقیق حاضر هم‌سو بودند. کادر و همکاران (۱۶) با بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره اتانولی، کلروفرمی و پترولیوم اتری زنجیبل بر ۱۳ نوع باکتری و سه نوع قارچ با استفاده از روش دیسک دیفیوژن، تاثیر زنجیبل بر فعالیت عصاره روی قارچ‌ها و باکتری‌ها به‌ویژه *Vibrio parahemolyticus* را نشان دادند. کووان (۷) نیز در تحقیق خود اثر عصاره زنجیبل روی دو گونه از باکتری‌های گرم منفی *Vibrio alginolyticus* و *V. parahemolyticus* را اثبات نمود. در مورد تأثیر ضد باکتریایی کنگر فرنگی در مطالعه‌ای (۳۸) به تاثیر عصاره الکلی کنگر فرنگی بر رشد باکتری *S. aureus* اشاره شد که با تحقیق حاضر سازگار است.

در تحقیق حاضر عصاره‌های زنجیبل و کنگر فرنگی با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر باعث ایجاد هاله عدم رشد به قطر ۱۵ میلی‌متر در محیط حاوی سویه استاندارد *S. aureus* شدند. در مورد سویه پاتوژن نیز هاله‌ای به قطر حدود ۹ - ۸ میلی‌متر مشاهده گردید. طبق نتایج به دست آمده از آزمون MIC در این پژوهش، بالاترین غلظت به‌کار رفته یعنی ۵۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره‌های زنجیبل و کنگر فرنگی اثرات بازدارندگی رشدی بر سویه استاندارد و پاتوژن نداشتند. با توجه به این که در آزمون دیسک-گذاری از غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (۰.۱۰۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) عصاره‌ها استفاده شد و هاله عدم رشد در این غلظت مشاهده گردید بنابراین حداقل غلظت بازدارندگی این عصاره‌ها احتمالاً در غلظت‌های بالاتر از ۵۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر خواهد بود. از آنجا که هدف اصلی این پژوهش، بررسی اثر عصاره‌های مذکور بر بیان ژن‌های بیوفیلم بود، با این آزمون اطمینان حاصل شد که

این اساس باعث مهار بیان ژن بیوفیلم *icaD* تقریباً به‌طور كامل گردید. آنالیز واریانس ANOVA داده‌های حاصل از بیان نسبی ژن با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۱۰٪ صورت گرفت. نتایج آنالیز ANOVA نشان داد که کاهش بیان ژن *icaD* در سویه پاتوژن تحت تأثیر عصاره‌های کنگر فرنگی و زنجیبل دارای اختلاف معنی دار (P<0.01) نسبت به نمونه کنترل می‌باشد (شکل ۴).



شکل ۴- اطلاعات حاصل از آنالیز نتایج ریل تایم سویه پاتوژن *S. aureus*

بحث

گیاهان دارویی از دیرباز برای درمان عفونت‌های باکتریایی استفاده شده‌اند. اخیراً به دلیل بروز مقاومت‌های دارویی، به منابع گیاهی به عنوان مخازن طبیعی توجه بیشتری شده است.

در این تحقیق، بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره زنجیبل و کنگر فرنگی به روش انتشار از دیسک روی سویه استاندارد و نیز سویه پاتوژن باکتری *S. aureus* نشان داد که سویه استاندارد نسبت به عصاره‌های مذکور از حساسیت بیشتری برخوردار است درحالی که سویه پاتوژن مقاومت بیشتری را نشان می‌دهد. در مطالعه‌ای که مؤمنی و زمانزد (۲۱) به بررسی اثرات ضد میکروبی زنجیبل بر روی چند نمونه باکتری از جمله *S. aureus* پرداختند نشان داده شد که *S. aureus* نسبت به عصاره الکلی زنجیبل حساس است ولی نسبت به عصاره آبی زنجیبل نیمه‌حساس می‌باشد.

سویه پاتوژن در مورد ژن *icaD* و در مورد توالی‌های تنظیمی این ژن اثبات گردید که این تفاوت در میزان بیان ژن می‌تواند ناشی از جهش در ژن *icaD* یا جهش در نواحی تنظیمی این ژن باشد. سویه‌های پاتوژن نسبت به سویه‌های استاندارد *S. aureus* می‌توانند تفاوت‌های ژنتیکی بسیار زیادی داشته باشند که این تفاوت عمدتاً حاصل جهش‌های ژنتیکی است. لازم به ذکر است که ژن *icaD* از جمله ژن‌های حیاتی باکتری نیست بنابراین ممکن است غلظت بالای عصاره‌ها در هر دو سویه استاندارد و پاتوژن مانع رشد و تکثیر باکتری شود ولی این احتمال وجود دارد که سویه‌های استاندارد و پاتوژن بر اثر جهش توالی‌های خاص از جمله ژن *icaD* یا نواحی تنظیمی این ژن دچار تفاوت شده باشند و پاسخ ژن *icaD* نسبت به عصاره‌های گیاهی در سویه استاندارد و پاتوژن باکتری مورد مطالعه نیز متفاوت باشد و عصاره‌های گیاهی به‌کار رفته در سویه استاندارد به عنوان فعال‌کننده و در سویه پاتوژن به عنوان مهارکننده ژن بیوفیلم *icaD* عمل نمایند.

با توجه به این که یکی از راه‌های کسب مقاومت باکتری‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک، تولید بیوفیلم است شاید استفاده از عصاره‌های گیاهی زنجیبل و کنگر فرنگی بتواند در اثربخشی آنتی‌بیوتیک‌ها بسیار مؤثر واقع شود.

نتیجه گیری کلی

در مجموع بر اساس نتایج این پژوهش می‌توان گفت که زنجیبل به عنوان یک عامل ضد باکتریایی برای درمان *S. aureus* سویه پاتوژن عمل کرده و از بیان ژن *icaD* و در نتیجه تشکیل بیوفیلم جلوگیری می‌کند. عصاره کنگر فرنگی خواص ضد میکروبی خوبی از خود نشان داد. این عصاره طبیعی روی *S. aureus* هم اثربخش بود. عصاره کنگر فرنگی همانند عصاره زنجیبل توان کاهش بیان ژن بیوفیلم *icaD* را داشت اما ترکیب عصاره‌های کنگر فرنگی و زنجیبل قدرت قدرت بیان ژن بیوفیلم *icaD* را به طور قابل‌توجهی کاهش داد. با توجه به این که تولید بیوفیلم باعث

غلظت ۵۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره‌ها منجر به مرگ باکتری‌های مورد نظر نشده و امکان بررسی تغییرات بیان ژن وجود خواهد داشت و به همین دلیل بررسی MIC در غلظت‌های بالاتر عصاره‌ها غیرضروری به نظر رسید.

هدف اصلی این تحقیق، بررسی تأثیر عصاره زنجیبل و کنگر فرنگی بر میزان بیان ژن بیوفیلم *icaD* بود. طبق تحقیقات نیکولیک و همکاران (۲۴)، اثر ضد بیوفیلمی عصاره الکلی *Pseudomonas* روی باکتری‌های نظیر *E. coli* و *Proteus mirabilis aeruginosa* رسیده است. کیم و پارک (۱۸) به تأثیر ضد بیوفیلمی عصاره زنجیبل روی *P. aeruginosa* اشاره کردند. گاد و همکاران (۱۲) اذعان داشتند که تمام سویه‌های *S. aureus* تولیدکننده بیوفیلم، دارای ژن‌های *icaA* و *icaD* هستند. همچنین در مطالعه دیگری (۱۳) اثر ضد بیوفیلمی زنجیبل روی ۲۵ سویه از *S. aureus* بررسی و نشان داده شد که ۲۳ سویه از آنها دارای توانایی تولید بیوفیلم و واحد ژن *icaD* می‌باشند. تحقیقات بیشتری در زمینه اثر ضد بیوفیلمی زنجیبل و نیز بررسی وجود ژن‌های مرتبط با تولید بیوفیلم وجود دارد ولی در مورد تأثیر عصاره‌های زنجیبل و کنگر فرنگی بر تغییرات بیان ژن بیوفیلم *icaD* گزارشی دیده نشد.

در پژوهش حاضر با استفاده از تکنیک PCR و آغازگرهای اختصاصی، وجود ژن *icaD* در هر دو سویه *S. aureus* مورد مطالعه، اثبات شد. بررسی نتایج حاصل از Real time PCR نشان داد که میزان بیان ژن *icaD* در سویه پاتوژن به ترتیب تحت تیمار زنجیبل به ۲۸ درصد، تحت تیمار کنگر فرنگی به ۱۰ درصد و تحت تأثیر ترکیبی از این دو عصاره به ۳۰ درصد کاهش یافت که این نتایج در مورد سویه استاندارد بسیار متفاوت است زیرا در سویه استاندارد تیمار زنجیبل، کنگر فرنگی و ترکیبی از این دو گیاه به ترتیب باعث افزایش $7/8$ ، $7/3$ و $2/8$ برابری شدند. علاوه بر این در این پژوهش، تفاوت ژنتیکی دو سویه ATCC 25923 و

تولید بیوفیلم و از بین بردن این باکتری پاتوژن بسیار ارزشمند خواهد بود.

مقاومت باکتری نسبت به مواد ضد میکروبی می‌شود، استفاده همزمان عصاره کنگر فرنگی و زنجیبل در کاهش

منابع

- ۲- چوری، م، بوذرپور، س، مرادی، ع، جرجانی، ع. ۱۳۹۷. بررسی اثر نانوکورکومین دندروزومی بر بیان ژن‌های POU5F1 و NANOG در رده سلولی Caco-2 سرطان کولون. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی مجله، جلد ۳۱، شماره ۳، ۲۹۲-۲۹۶.

۳۰۱

- 3- Anuar, N.S., Zahari, S.S., Taib, I.A., Rahman, M.T. 2008. Effect of green and ripe *Carica papaya* epicarp extracts on wound healing and during pregnancy. Food and Chemical Toxicology 46 (7): 2384-2389.
- 4- Archer, N.K., Mazaitis, M.J., Costerton, J.W., Leid, J.G., Powers, M.E., Shirtliff, M.E. 2011. *Staphylococcus aureus* biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. Virulence 2 (5): 445-459.
- 5- Atshan, S.S., Nor Shamsudin, M., Sekawi, Z., Than, L.T.L., Awang Hamat, R., Karunanidhi, A., Alreshidi, M.A., Ghaznavi-Rad, E., Ghasemzadeh-Moghaddam, H., Chong Seng, J.S., Jeevajothi Nathan, J., Chong, P.P. 2012. Prevalence of adhesion and regulation of biofilm-related genes in different clones of *Staphylococcus aureus*. Journal of Biomedicine and Biotechnology DOI: 10.1155/2012/976972.
- 6- Cerca, N., Pier, G.B., Vilanova, M., Oliveira, R., Azeredo, J. 2005. Quantitative analysis of adhesion and biofilm formation on hydrophilic and hydrophobic surfaces of clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. Research in Microbiology 156 (4): 506-514.
- 7- Cowan, M.M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. Clinical Microbiology Reviews 12 (4): 564-582.
- 8- Darwish, R.M., Aburjai, T., Al-Khalil, S., Mahafzah, A. 2002. Screening of antibiotic resistant inhibitors from local plant materials against two different strains of *Staphylococcus aureus*. Journal of Ethnopharmacology 79 (3): 359-364.
- 9- Donlan, R.M., Costerton, J.W. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clinical Microbiology Reviews 15 (2): 167-193.
- 10- Fitzpatrick, F., Humphreys, H., O'Gara, J.P. 2005. Evidence for icaADBC-independent

biofilm development mechanism in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. Journal of Clinical Microbiology 43(4): 1973-1976.

- 11- Gaafar, A., Salama, Z. 2013. Phenolic compounds from artichoke (*Cynara scolymus* L.) by-products and their antimicrobial activities. Journal of Biology, Agriculture and Healthcare 3: 1-6.
- 12- Gad, G.F.M., El-Feky, M.A., El-Rehewy, M.S., Hassan, M.A., Abolella, H., El-Baky, R.M.A. 2009. Detection of icaA, icaD genes and biofilm production by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from urinary tract catheterized patients. The Journal of Infection in Developing Countries 3 (05): 342-351.
- 13- Hamasalih, R.M., Abdulrahman, Z.F.A. 2020. Antibiofilm potency of Ginger (*Zingiber officinale*) and quercetin against *Staphylococcus aureus* isolated from urinary catheterized patients. Applied Ecology and Environmental Research 18(1), 219-236.
- 14- Harvey, J., Gilmour, A. 1988. Isolation and characterization of staphylococci from goats milk produced in northern Ireland. Letters in Applied Microbiology 7:79-82.
- 15- Islam, K., Rowsni, A.A., Khan, M.M., & Kabir, M.S. 2014. Antimicrobial activity of ginger (*Zingiber officinale*) extracts against food-borne pathogenic bacteria. International Journal of Science, Environment and Technology 3(3): 867-871.
- 16- Kader, G., Nikkon, F., Rashid, M.A., Yeasmin, T. 2011. Antimicrobial activities of the rhizome extract of Zingiber zerumbet Linn. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine 1(5): 409-412.
- 17- Khosravi-Darani, K., Khaksar, R., Esmaeili, S., Seyed-Reihani, F., Zoghi, A., Shahbazizadeh, S. 2013. Antifungal and anti-bacterial synergistic

- effects of mixture of honey and herbal extracts. Zahedan Journal of Research in Medical Sciences 15 (8): 30-33.
- 18- Kim, H.S., Park, H.D. 2013. Ginger extract inhibits biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. PloS One 8(9): e76106.
- 19- McCarthy, H., Rudkin, J.K., Black, N.S., Gallagher, L., O'Neill, E., O'Gara, J.P. 2015. Methicillin resistance and the biofilm phenotype in *Staphylococcus aureus*. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology 5(1): 1-9.
- 20- Mocelin, R., Marcon, M., Santo, G.D., Zanatta, L., Sachett, A., Schönell, A.P., Bevilaqua, F., Giachini, M., Chitolina, R., Wildner, S.M. 2016. Hypolipidemic and antiatherogenic effects of *Cynara scolymus* in cholesterol-fed rats. Revista Brasileira de Farmacognosia 26 (2): 233-239.
- 21- Momeni, L., Zamanzad, B. 2010. Evaluation of antimicrobial effects of onion and ginger extracts on some bacteria and *Candida albicans* isolated infected urinary systems. Journal of Shahrekord University of Medical Sciences 11 (4): 81-87.
- 22- Montazeri, A., Salehzadeh, A., & Zamani, H. 2020. Effect of silver nanoparticles conjugated to thiosemicarbazide on biofilm formation and expression of intercellular adhesion molecule genes, icaAD, in *Staphylococcus aureus*. Folia Microbiologica, 65(1), 153-160.
- 23- Nelson, C., Regiland, A. 2007. Antimicrobial properties of extracts of *Allium cepa* and *Zingiber officinale* (ginger) on *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* and *Bacillus subtilis*. International Journal of Tropical Medicine 3 (2): 1540-1470.
- 24- Nikolić, M., Vasić, S., Durdević, J., Stefanović, O., Čomić, L. 2014. Antibacterial and anti-biofilm activity of ginger (*Zingiber officinale* (Roscoe)) ethanolic extract. Kragujevac Journal of Science (36), 129-136.
- 25- Norajit, K., Laohakunjit, N., Kerdchoechuen, O. 2007. Antibacterial effect of five Zingiberaceae essential oils. Molecules 12 (8): 2047-2060.
- 26- O'Mahony, R., Al-Khtheeri, H., Weerasekera, D., Fernando, N., Vaira, D., Holton, J., Basset, C. 2005. Bactericidal and anti-adhesive properties of culinary and medicinal plants against *Helicobacter pylori*. World Journal of Gastroenterology 11(47): 7499-7507.
- 27- Omoya, F., Akharaiyi, F. 2011. Mixture of honey and ginger extract for antibacterial assessment on some clinical isolates. International Journal of Pharmaceutical and Biomedical Research 2 (1): 39-47.
- 28- Rajasekar, T., Usharani, J., Sakthivel, M., Deivasigamani, B. 2011. Immunostimulatory effects of *Cardiospermum halicacabum* against *Vibrio parahaemolyticus* on tiger shrimp *Penaeus monodon*. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research 3 (5): 501-513.
- 29- Raphael, T., Kuttan, G. 2003. Immunomodulatory activity of naturally occurring monoterpenes carvone, limonene, and perillie acid. Immunopharmacology and Immunotoxicology 25 (2): 285-294.
- 30- Roberts, S., O'Shea, K., Morris, D., Robb, A., Morrison, D., Rankin, S. 2005. A real-time PCR assay to detect the Panton Valentine Leukocidin toxin in staphylococci: screening *Staphylococcus schleiferi* subspecies *coagulans* strains from companion animals. Veterinary Microbiology 107(1-2): 139-144.
- 31- Rosenberg, M. 1981. Bacterial adherence to polystyrene: a replica method of screening for bacterial hydrophobicity. Applied and Environmental Microbiology 42 (2): 375-377.
- 32- Salehzadeh, A., Zamani, H., Langeroudi, M. K., & Mirzaie, A. 2016. Molecular typing of nosocomial *Staphylococcus aureus* strains associated to biofilm based on the coagulase and protein A gene polymorphisms. Iranian journal of basic medical sciences, 19(12), 1325.
- 33- Srinivasan, D., Nathan, S., Suresh, T., Perumalsamy, P.L. 2001. Antimicrobial activity of certain Indian medicinal plants used in folkloric medicine. Journal of Ethnopharmacology 74 (3): 217-220.
- 34- Stehling, E.G., da Silveira, W.D., da Silva Leite, D. 2008. Study of biological characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients with cystic fibrosis and from patients with extra-pulmonary infections. Brazilian Journal of Infectious Diseases 12 (1): 86-88.
- 35- Taj, Y., Essa, F., Aziz, F., Kazmi, S.U. 2012. Study on biofilm-forming properties of clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. The Journal of Infection in Developing Countries 6 (05): 403-409.
- 36- Yassen, D., Ibrahim, A.E. 2016. Antibacterial activity of crude extracts of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*: A study *in vitro*. Indo American Journal of Pharmaceutical Research 6 (06): 5830-5835.

- 37- Zhu, X., Zhang, H., Lo, R. 2004. Phenolic compounds from the leaf extract of artichoke (*Cynara scolymus* L.) and their antimicrobial activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(24): 7272-7278.
- 38- Zhu, X., Zhang, H., Lo, R., Lu, Y. 2005. Antimicrobial activities of *Cynara scolymus* L. leaf, head, and stem extracts. *Journal of Food Science* 70 (2): 149-152.

Molecular study of *icaD* biofilm gene expression by extract of ginger and artichoke in *Staphylococcus aureus*

Qodrat M.¹, Habibollahi H.¹ and Safari Motlagh M.R.^{2*}

¹ Dept. of Biology, Faculty of Sciences, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, I.R. of Iran

² Dept. of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, I.R. of Iran

Abstract

Biofilm is an accumulation of bacteria that increase binding to biological and non-biological levels and causes pathogenicity and infection in *Staphylococcus aureus*. The *icaABCD* operon genes are involved. The *icaD* gene plays an important role in the maximal expression of the enzyme N-acetylglucosamine transferase and leads to the phenotypic expression of extracellular polysaccharide in *S. aureus*. Many medicinal plants have antibacterial properties. In this study, based on antibiogram test, the antimicrobial effect of ginger and artichoke extract on two strains of *S. aureus* was studied. Also, in the studied strains, after the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) tests, using real time PCR technique, the expression of *icaD* biofilm gene under the treatment of artichoke and ginger extracts was evaluated. The results of disk diffusion test showed that the concentration of 100 mg/ml of ginger and artichoke extracts in the standard and the pathogen strains of *Staphylococcus aureus*, create a inhibition zone of 15 mm and about 9 mm, respectively. MIC test also showed that the studied strains can grow at a concentration of 5000 µg/ml of plant extracts. The results of *icaD* gene expression under the influence of artichoke and ginger extracts in the standard strain showed an increase in the expression of this gene. However, in the pathogen strain of *Staphylococcus aureus*, ginger and artichoke extracts led to a significant reduction ($P<0.01$) in *icaD* gene expression to about 28% and 10% of the control sample, respectively.

Key words: Artichoke, Biofilm, Ginger, *icaD* gene, *Staphylococcus aureus*.