DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.3.2.0

مطالعه‌ی مولکولی بیان ژن بیوفیلم *icaD* تحت اثر عصاره گیاهان زنجبیل و کنگر فرنگی در باکتری *Staphylococcus aureus*

متین قدرت[۱]، هادی حبیب‌الهی[۱] 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: ۱۳۹۹/۰۶/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۰/۲۴

چکیده

بیوفیلم تجمعی از باکتری‌ها می‌باشد که باعث افزایش اتصال به سطوح بیولوژیکی و غیربیولوژیکی شده و در باکتری *Staphylococcus aureus* باعث ایجاد بیماری‌زایی و عفونت می‌گردد. ژن‌های اپرونی *icaABCD* در این امر دخالت دارند. ژن *icaD* نقش مهمی در حداکثر بیان آنزیم N – استیل گلوکزآمین ترانسفراز دارد و منجر به بیان فنوتیپیک پلی‌ساکارید خارج سلولی در *S. aureus* می‌شود. گیاهان دارویی بسیاری دارای خاصیت ضد باکتریایی هستند. در این تحقیق، تأثیر ضد میکروبی عصاره زنجبیل 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 زنجبیل در سویه‌های مورد مطالعه ارزیابی شد. نتایج حاصل از آزمون انتشار از دیسک نشان داد که غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره زنجبیل و نیز کنگر فرنگی در سویه استاندارد و پاتوژن *S. aureus*، به‌ترتیب 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 زنجبیل در سویه استاندارد بیانگر افزایش بیان این ژن بود ولی در سویه پاتوژن *S. aureus*، عصاره‌های زنجبیل و کنگر فرنگی با اختلاف معنی‌دار $P<0.01$ به‌ترتیب منجر به کاهش قابل‌توجه بیان ژن *icaD* به حدود ۲۸ درصد و ۱۰ درصد نمونه کنترل شدند.

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

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۱۱۳۸۴۱۶۸ ، پست الکترونیکی: ssafarimotlagh@yahoo.com

مقدمه

Staphylococcus aureus یکی از پاتوژن‌های مهم و شایع عفونت‌های بیمارستانی است که با داشتن آنزیم‌های 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 دارا است و این توانایی به دلیل انطباق و سازگاری بسیار زیاد 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 ضدعفونی-کننده‌ها، مقاومت نشان داده‌اند (۲۷). سویه‌هایی از *S. aureus* که این مواد را تولید می‌کنند، ظرفیت کلونیزاسیون بالایی نسبت به سویه‌هایی که این دو عامل را تولید نمی-

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.3.2.0

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

بیوفیلم را می‌توان یک اجتماع باکتریایی 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 سلول-های 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 کاتترها، لوله‌های حلقی و لنزهای تماسی و نیز عفونت بافت‌های زنده مانند عفونت اندوکارد، عفونت زخم و عفونت اپی‌تلیوم ریه مخصوصا در بیماران مبتلا به فیبروز کیستی شود (۳۵). تولید بیوفیلم ناشی از فعالیت اپرانی تحت عنوان *icaABCD* می‌باشد که مهم‌ترین عامل برای تشکیل ماتریکس اگزوپلی‌ساکاریدی است که از عوامل چسبندگی بین‌سلولی بوده و پروتئین‌های عوامل اتصالی بین‌سلولی *icaA*، *icaB*، *icaC* و *icaD* در تولید آن دخالت دارند (۱۲، ۲۲ و ۳۲). این پلی‌ساکارید پلیمری از واحدهای گلیکوز آمینوگلیکان می‌باشد که توسط آنزیم ان-استیل گلوکز آمینیل ترانسفراز سنتز می‌شود. بیان این آنزیم توسط لوکوس‌های *ica* انجام می‌شود (۴). از میان ژن‌های لوکوس *ica* (Intracellular adhesin) بیان هم‌زمان دو ژن *icaA* و *icaD* در *S. aureus* موجب افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی و بیماری‌زایی می‌شود (۱۰).

محرک‌های ایمنی عواملی هستند که با هدف قرار دادن ایمنی غیراختصاصی موجود سبب افزایش مقاومت میزبان در برابر بیماری می‌شوند (۲۸). یکی از محرک‌های ایمنی موثر و قوی، گیاهان و ترکیبات آنها هستند که می‌توانند جایگزین داروهای شیمیایی شوند (۳۳). به‌منظور کاهش زیان‌های اقتصادی و خطرات جانی ناشی از عوامل بیماری-زای میکروبی، استفاده از مواد طبیعی به‌عنوان ترکیبات ضدمیکروبی می‌تواند روشی مؤثر برای کنترل باکتری‌های بیماری‌زا باشد (۳). استفاده بی‌رویه و بدون تجویز پزشک از آنتی بیوتیک‌ها، مقاومت‌های روبه گسترش میکروارگانیسم-ها نسبت به آنتی بیوتیک‌های رایج درمانی، عوارض نامطلوب و جانبی ناشی از استفاده آنها و از طرفی مقرون به صرفه‌نبودن ساخت برخی داروهای شیمیایی باعث سوق صنعت داروسازی به گیاهان دارویی شده است تا دوباره توجه جوامع پزشکی و محققین به پزشکی سنتی، فیتوتراپی و مواد مؤثره موجود در گیاهان دارویی (فنل، فلاونوئیدها، فلاون‌ها، ترپن‌ها و ...) معطوف گردد (۲۹). عصاره گیاهان دارویی مختلفی همچون زردچوبه برای درمان سرطان کولون (۲) به‌کار رفته‌اند. همچنین فعالیت ضدباکتریایی عصاره هیدروالکلی گیاهان آویشن و به‌لیمو 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 به‌عنوان 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 باکتریایی پیاز و زنجبیل روی باکتری‌های *Escherichia coli*، *Bacillus subtilis* و *Salmonella typhimurium* را به اثبات رسانده‌اند. نتایج نشان داد که زنجبیل حاوی مواد ضد میکروبی فلاونوئیدی است (۲۳). بررسی خاصیت ضد باکتریایی عصاره خام آبی و الکلی پیاز و زنجبیل در برابر *S. aureus*، *Pseudomonas aeruginosa*، *E. coli* و *Candida albicans* جداشده از

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.3.2.0

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

در مطالعه‌ای اثر عصاره برگ گیاه کنگر فرنگی در برابر باکتری‌های *Bacillus subtilis*، *S. aureus*، *Agrobacterium tumefaciens*، *Micrococcus luteus*، *E. coli*، *S. typhimurium* و *P. aeruginosa*، مخمرهای *C. albicans*، *C. lusitaniae*، *Saccharomyces cerevisiae* و *S. carlsbergensis*، قارچ‌های *Aspergillus niger*، *Penicillium oxalicum*، *Mucor mucedo* و *Cladosporium cucumerinum* مورد بررسی قرار گرفت و 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، زنجبیل، 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 اریترومایسین مقاوم بودند، سبب توقف رشد باکتری‌ها گردید (۸). در بررسی خواص ضد باکتریایی اسانس‌های گیاهان خانواده Zingiberaceae گیاه زنجبیل 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 زنجبیل بر ۱۳ نوع باکتری و سه نوع قارچ با استفاده از روش دیسک دیفیوژن، حلال اتانولی زنجبیل بیشترین تاثیر فعالیت عصاره روی قارچ‌ها و باکتری‌ها به‌ویژه *Vibrio parahemolyticus* را نشان داد (۱۶).

در تحقیقی اثر عصاره زنجبیل روی دو گونه از باکتری‌های گرم منفی *Vibrio alginolyticus* و *V. parahemolyticus* 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 کنگرفرنگی نشان داد که حداکثر فعالیت ضد میکروبی در عصاره متانولی فنل‌های متصل (برگچه‌ها و گل‌ها) علیه باکتری‌های گرم منفی به‌دست می‌آید (۱۱).

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

هدف از این تحقیق مطالعه‌ی مولکولی بیان ژن بیوفیلم *icaD* تحت اثر عصاره گیاهان زنجبیل و کنگر فرنگی در باکتری *S. aureus* 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 زنجبیل با نام زینتوما (Zintoma capsule) از شرکت داروسازی گل دارو تهیه گردید. هر کپسول زینتوما محتوی ۲۵۰ میلی‌گرم گرانول پودر ریزوم زنجبیل 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 استوک ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تهیه گردید.

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.3.2.0

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 هینتون آگار روی پلیت انجام گرفت. پلیت‌های حاوی باکتری در انکوباتور به‌مدت ۲۴ ساعت نگهداری و سپس در محیط مولر هینتون براث کشت داده شدند. ۲۴ ساعت پس از کشت، کدورتی معادل محیط نیم مک فارلند آماده 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 زنجبیل و کنگر فرنگی به‌طور جداگانه آغشته شد و در محیط کشت مولر هینتون آگار حاوی باکتری، دیسک‌گذاری انجام گردید. علاوه بر این از ترکیب ۱۰۰ میلی‌گرم عصاره‌های زنجبیل 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 هینتون براث انجام شد. برای تهیه مولر هینتون 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 میلی لیتر (۱۰۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) 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 میلی لیتر از لوله شماره ۱ به لوله شماره ۲، ۲ میلی‌لیتر از لوله شماره ۲ به لوله شماره ۳ و به‌ترتیب تا لوله شماره ۸ انتقال یافت و عملیات رقیق‌سازی سریالی انجام شد. لوله‌های شماره ۹ و ۱۰ نیز به‌ترتیب به‌عنوان 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 زنجبیل، 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 Bactericidal 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 هینتون آگار به صورت چمنی و یک‌دست کشت داده شدند و بعد از آن به مدت ۲۴ ساعت پلیت‌ها از لحاظ رشد باکتری مورد بررسی قرار گرفتند.

استخراج DNA: برای استخراج DNA از دو سویه مورد مطالعه رشدیافته در محیط مولر هینتون 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
Icad-F	ACCCAACGCTAAAATCATCG
Icad-R	GCGAAAATGCCCATAGTTTC

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.3.2.0

واکنش PCR ژن *icaD* با استفاده از مواد واکنش‌گر و برنامه دمایی که به‌ترتیب 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 150 ولت، با قرار دادن ژل بر روی دستگاه UV Transilluminator، باندهای محصول PCR رؤیت و ارزیابی گردید.

جدول ۲- مواد واکنش‌گر مورد استفاده در PCR ژن *icaD*

واکنش‌گر	حجم (میکرولیتر)
آب مقطر	15.5
PCR بافر (10X)	2.5
MgCl2 (10mM)	1.5
dNTPs (10mM)	1
آغازگر مستقیم (10p.mol)	0.5
آغازگر معکوس (10p.mol)	0.5
DNA الگو	3
Taq polymerase (100U/µl)	0.5
حجم کل	25

جدول ۳- شرایط بهینه دمایی PCR ژن *icaD*

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

استخراج RNA: بر اساس نتایج حاصل از MIC و MBC، حداکثر غلظت عصاره‌های زنجبیل 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 ترایزول شرکت ROJETechnologies، طبق دستورالعمل کیت و با رعایت شرایط استریل و در دمای پایین انجام شد.

سنتز cDNA: با استفاده از RNAهای استخراج شده و با استفاده از کیت سنتز شرکت Parstous biotechnology و طبق پروتکل این کیت، سنتز cDNA انجام شد. سنتز cDNA با استفاده از آغازگرهای تصادفی هگزامر انجام شد و محصول این سنتز به‌منظور بررسی میزان بیان ژن *icaD* تحت تأثیر عصاره زنجبیل و کنگر فرنگی در هر دو سویه مورد نظر برای ریل تایم به‌کار گرفته شد. در این روش از ژن *16s rRNA* به‌عنوان ژن مرجع استفاده گردید.

واکنش Real time 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 Dyeبه 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 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

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.3.2.0

مقایسه با ژن مرجع *16SrRNA* استفاده گردید. جدول ۴ توالی آغازگرهای مربوط به ژن‌های *icaD* و *16SrRNA* را نشان می‌دهد (۵).

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

آغازگر	توالی	اندازه محصول
icaD-F	ACCCAACGCTAAAATCATCG	۲۱۱ bp
icaD-R	GCGAAAATGCCCATAGTTTC	
16SrRNA-F	GGGACCCGCACAAGCGGTGG	۱۹۱ bp
16SrRNA-R	GGGTTGCGCTCGTTGCGGGA	

نتایج

اثر ضد میکروبی عصاره‌های گیاهی زنجبیل و کنگر فرنگی: برای انجام این آزمایش، روش دیسک‌گذاری و آغشته‌سازی دیسک‌ها با محلول ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره‌های گیاهان زنجبیل و کنگر فرنگی و نیز ترکیبی از هردو عصاره برای هر دو سویه استاندارد و پاتوژن باکتری *S. aureus* با دو تکرار به‌کار رفت. قطر هاله عدم رشد در جدول ۵ نشان داده شده است.

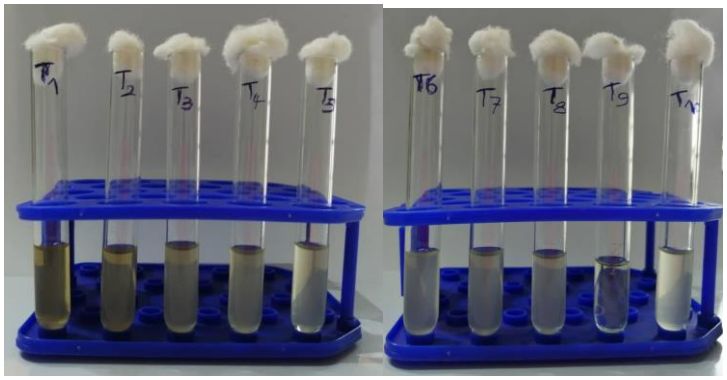
جدول ۵- قطر هاله عدم رشد سویه‌های مورد مطالعه باکتری تحت تیمار به روش دیسک‌گذاری

نوع سویه *S. aureus*	نوع تیمار با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر)
سویه استاندارد	زنجبیل	۱۵
	کنگر فرنگی	۱۵
	ترکیبی از هر دو گیاه	۱۵
سویه پاتوژن	زنجبیل	۹
	کنگر فرنگی	۸
	ترکیبی از هر دو گیاه	۰

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

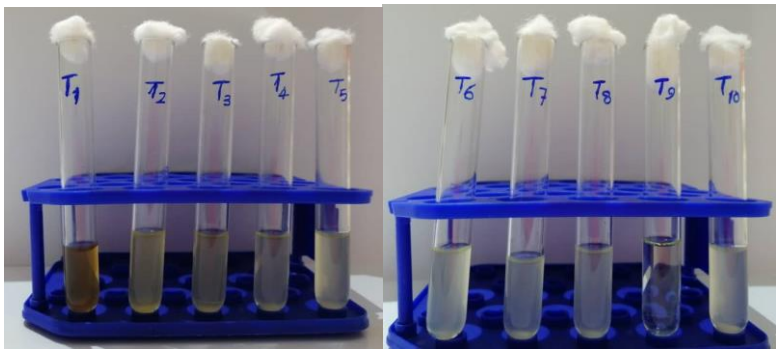
بررسی وجود ژن *icaD* : به‌منظور اثبات وجود ژن *icaD* در سویه‌های *S. aureus* مورد مطالعه، آغازگرهای اختصاصی این ژن مورد استفاده قرار گرفت و پس از انجام PCR در شرایط بهینه دمایی و زمانی مطلوب، باندی در محدوده ۲۱۰ جفت بازی که مطابق با مقاله (Atshan et al., 2012) بود، حاصل گردید.

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.3.2.0



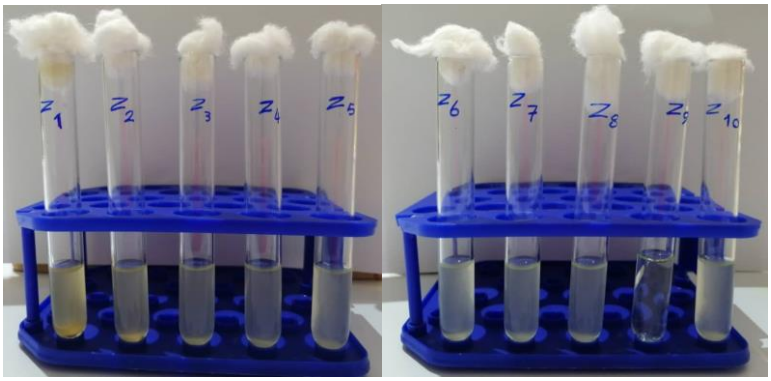
شکل ۱- (الف): سویه پاتوژن استافیلوکوکوس اورئوس + عصاره کنگر فرنگی (T)

لوله شماره ۱: غلظت ۵۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره، لوله شماره ۸: غلظت ۳۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر 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)

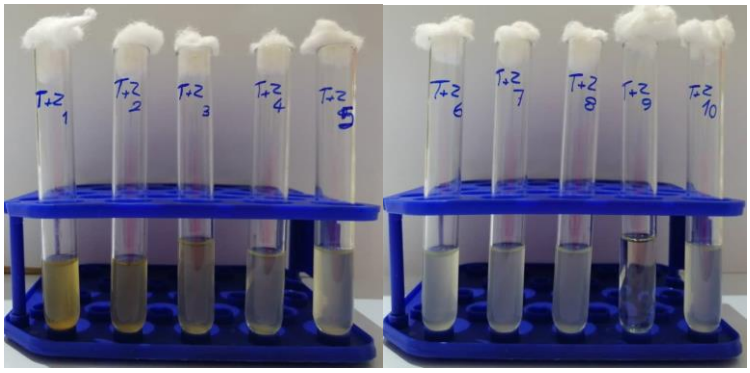
لوله شماره ۱: غلظت ۵۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره، لوله شماره ۸: غلظت ۳۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره، لوله شماره ۹: کنترل منفی (عصاره کنگر فرنگی بدون باکتری) لوله شماره ۱۰: کنترل مثبت (باکتری بدون عصاره کنگر فرنگی)



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

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

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.3.2.0



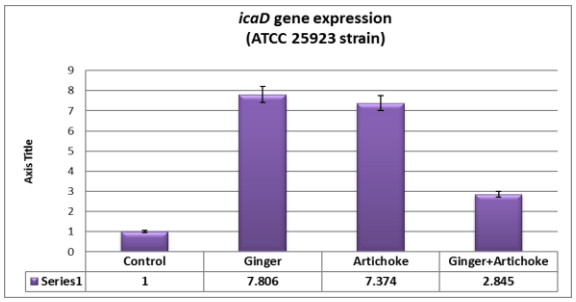
شکل ۱ – (د): سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس – کنگر فرنگی (T) + زنجبیل (Z)

لوله شماره ۱: غلظت ۵۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از ترکیب ۱:۱ هر دو عصاره، لوله شماره ۸: غلظت ۳۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر 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)

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

شکل ۲– باندهای حاصل از استخراج *RNA*

بررسی بیان ژن *icaD* در سویه استاندارد: مقایسه میزان بیان ژن *icaD* در سویه استاندارد بین نمونه‌های تیمار شده با عصاره زنجبیل، تیمار شده با کنگر فرنگی و تیمار توأم عصاره زنجبیل وکنگر 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 زنجبیل منجر به افزایش ۸/۷ برابری بیان ژن *icaD* و تیمار این باکتری با کنگر فرنگی باعث افزایش ۳/۷ برابری بیان این ژن بیوفیلم شد. استفاده همزمان از عصاره زنجبیل و کنگر فرنگی، میزان بیان ژن بیوفیلم *icaD* را ۸/۲ برابر نمونه بدون تیمار افزایش داد (شکل ۳).

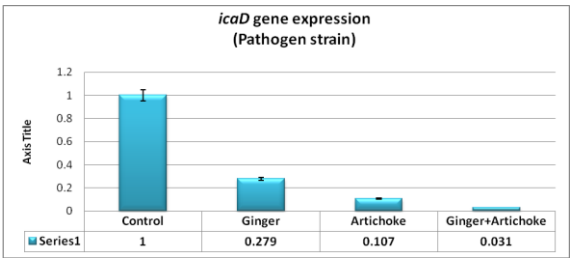


شکل ۳– اطلاعات حاصل از آنالیز نتایج ریل تایم سویه استاندارد *S. aureus*

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 نمونه‌های تیمار شده با عصاره زنجبیل، تیمار شده با کنگر فرنگی و تیمار توأم عصاره زنجبیل و کنگر فرنگی، بیان ژن *icaD* تحت تیمار عصاره زنجبیل در این سویه، تا ۲۸درصد 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 عصاره‌های زنجبیل و کنگر فرنگی، کاهش ۹۷ درصدی در بیان این ژن بیوفیلم نشان داد و بر

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.3.2.0

این اساس باعث مهار بیان ژن بیوفیلم *icaD* تقریبا به‌طور کامل گردید. آنالیز واریانس ANOVA داده‌های حاصل از بیان نسبی ژن با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۰/۰۱ صورت گرفت. نتایج آنالیز ANOVA نشان داد که کاهش بیان ژن *icaD* در سویه پاتوژن تحت تأثیر عصاره‌های کنگر فرنگی و زنجبیل 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. اخیرا به دلیل بروز مقاومت‌های دارویی، به منابع گیاهی به‌عنوان مخازن طبیعی توجه بیشتری شده است.

در این تحقیق، بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره زنجبیل 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 زنجبیل بر روی چند نمونه باکتری از جمله *S. aureus* پرداختند نشان داده شد که *S. aureus* نسبت به عصاره الکلی زنجبیل حساس است ولی نسبت به عصاره آبی زنجبیل نیمه‌حساس می باشد.

در پژوهشی دیگر مشخص گردید که عصاره زنجبیل 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 زنجبیل 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 زنجبیل بر ۱۳ نوع باکتری و سه نوع قارچ با استفاده از روش دیسک دیفیوژن، تاثیر زنجبیل بر فعالیت عصاره روی قارچ‌ها و باکتری‌ها به‌ویژه *Vibrio parahemolyticus* را نشان دادند. کووان (۷) نیز در تحقیق خود اثر عصاره زنجبیل 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 تأثیر عصاره الکلی کنگر فرنگی بر رشد باکتری *S. aureus*، اشاره شد که با تحقیق حاضر سازگار است.

در تحقیق حاضر عصاره‌های زنجبیل 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 به‌دست آمده از آزمون MIC در این پژوهش، بالاترین غلظت به‌کار رفته یعنی ۵۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره‌های زنجبیل 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 (۱۰۰۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) عصاره‌ها استفاده شد و هاله عدم رشد در این غلظت مشاهده گردید بنابراین حداقل غلظت بازدارندگی این عصاره‌ها احتمالا 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

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.3.2.0

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 زنجبیل و کنگر فرنگی بر میزان بیان ژن بیوفیلم *icaD* بود. طبق تحقیقات نیکولیک و همکاران (۲۴)، اثر ضد بیوفیلمی عصاره الکلی زنجبیل روی باکتری‌هایی نظیر *Pseudomonas aeruginosa*، *Proteus mirabilis* و *E. coli* به اثبات رسیده است. کیم و پارک (۱۸) به تأثیر ضد بیوفیلمی عصاره زنجبیل 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 زنجبیل روی ۲۵ سویه از *S. aureus* بررسی و نشان داده شد که ۲۳ سویه از آنها دارای توانایی تولید بیوفیلم و واجد ژن *icaD* می‌باشند. تحقیقات بیشتری در زمینه اثر ضد بیوفیلمی زنجبیل و نیز بررسی وجود ژن‌های مرتبط با تولید بیوفیلم وجود دارد ولی در مورد تأثیر عصاره‌های زنجبیل 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 به‌ترتیب تحت تیمار زنجبیل به ۲۸ درصد، تحت تیمار کنگر فرنگی به ۱۰ درصد و تحت تاثیر 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 زنجبیل، کنگر فرنگی و ترکیبی از این دو گیاه به‌ترتیب باعث افزایش ۸/۷ ، ۳/۷ و ۸/۲ برابری شدند. علاوه بر این در این پژوهش، تفاوت ژنتیکی دو سویه ATCC 25923 و 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 عمدتا 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 به‌عنوان فعال کننده و در سویه پاتوژن به‌عنوان 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 زنجبیل و کنگر فرنگی بتواند در اثربخشی آنتی‌بیوتیک‌ها بسیار مؤثر واقع شود.

نتیجه گیری کلی

در مجموع بر اساس نتایج این پژوهش می‌توان گفت که زنجبیل به‌عنوان 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 زنجبیل توان کاهش بیان ژن بیوفیلم *icaD* را داشت اما ترکیب عصاره‌های کنگر فرنگی و زنجبیل قدرت بیان ژن بیوفیلم *icaD* را به‌طور قابل‌توجهی کاهش داد. با توجه به این که تولید بیوفیلم باعث

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.3.2.0

مقاومت باکتری نسبت به مواد ضد میکروبی می‌شود، استفاده همزمان عصاره کنگر فرنگی و زنجبیل در کاهش تولید بیوفیلم و از بین بردن این باکتری پاتوژن بسیار ارزشمند خواهد بود.

منابع

۱- اطمینانی، ف.، اطمینانی، ا. ۱۳۹۹. فعالیت ضد باکتریایی عصاره‌های هیدروالکلی گیاه آویشن و به لیمو بر باکتری *Pseudomonas syringae* در شرایط آزمایشگاهی. مجله پژوهش‌های سلولی و ملکولی مجله، جلد ۳۳، شماره ۱، ۱-۸.

۲- چوری، م.، بوذرپور، س.، مرادی، ع.، جرجانی، ع. ۱۳۹۷. بررسی اثر نانوکورکومین دندروزومی بر بیان ژن‌هایPOU5F1 و NANOG در رده سلولی Caco-2 سرطان کولون. مجله پژوهش‌های سلولی و ملکولی مجله، جلد ۳۱، شماره ۳، ۲۹۲-۳۰۱.

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 (*Zingeber 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

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.3.2.0

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 *Escherchia coli*, *Salmonella typhi* and *Bacillus subtilis*. International Journal of Tropical Medicine 3 (2): 1540-1470.

24- Nikolić, M., Vasić, S., Đurđević, 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 halicacubum* 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 perillic 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.

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.3.2.0

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*.