

Effect of Oak Galls Extracts on Streptococcus mutans Growth and Biofilm Formation

Maryam Mohammadi-Sichani¹,
Vajihe Karbasizadeh²,
Samaneh Chaharmiri Dokhaharani³

¹ Lecturer, Department of Microbiology, Islamic Azad University, Falavarjan Branch, Isfahan, Iran

² Assistant Professor, Department of Microbiology, Islamic Azad University, Falavarjan Branch, Isfahan, Iran

³ MSc in Microbiology, Young Researchers and Elite Club, Islamic Azad University, Falavarjan Branch, Isfahan, Iran

(Received June 20, 2014 ; Accepted February 4, 2015)

Abstract

Background and purpose: Dental caries is a pathological infectious disease. It begins with the formation of dental plaques which is a structurally and functionally organized biofilm. *Streptococcus mutans* is the most important bacterium in the formation of dental plaque and dental caries. This study aimed at evaluating the antibacterial and antibiofilm activity of *Quercus infectoria* galls against *Streptococcus mutans*.

Materials and methods: The bacterial strain used in this study was *Streptococcus mutans* (ATCC: 25923). Extracts were prepared by Soxhlet apparatus and maceration. They were then dissolved in sterile distilled water to a final concentration of 0.16 to 10.00 mg/ml. The antimicrobial activities of the extracts were determined using well diffusion method. The antibiofilm activities of the extracts were examined in a microdilution assay using TTC. Statistical analysis was performed in SPSS V.18.

Results: The methanol, ethanol, and acetone extracts of *Quercus infectoria* galls showed strong inhibitory effects against *Streptococcus mutans*. The MIC values of extracts were similar and ranged from 160µg/ml to 320µg/ml, whereas the MBC values ranged from 320µg/ml to 640µg/ml. Aqueous extracts of oak galls did not show antimicrobial activity. The extracts of *Quercus infectoria* galls strongly inhibited the formation of *Streptococcus mutans* biofilms at concentrations higher than 19.5µg/ml.

Conclusion: The extracts of *Quercus infectoria* galls displayed similarities in their antibacterial activity against *Streptococcus mutans*. Also, they were found effective in preventing biofilm formation of *Streptococcus mutans*. The galls of *Quercus infectoria* are considered potentially good sources of antimicrobial agent.

Keywords: Antibacterial activity, dental plaque, oak gall, plant extract, *Streptococcus mutans*

تأثیر عصاره های گال مازو بلوط بر رشد و تشکیل بیوفیلم استرپتوکوکوس موتانس

مریم محمدی سیچانی^۱
وجیهه کرباسی زاده^۲
سمانه چهارمیری دوخواهرانی^۳

چکیده

سابقه و هدف: پوسیدگی دندان عفونتی است که با تشکیل پلاک دندانی که از نظر ساختاری نوعی بیوفیلم محسوب می شود، ایجاد می گردد. استرپتوکوکوس موتانس شاخص ترین باکتری دهانی عامل ایجاد پلاک و پوسیدگی دندان است. هدف از این مطالعه ارزیابی فعالیت عصاره های اتانولی، متانولی، استونی و آبی گال مازو درختان بلوط بر رشد و جلوگیری از تشکیل بیوفیلم استرپتوکوکوس موتانس بوده است.

مواد و روش ها: از سویه باکتریایی استرپتوکوکوس موتانس (ATCC: 25923) به عنوان سویه استاندارد در تشکیل بیوفیلم استفاده شد. عصاره ها به روش خیساندن و سوکسله تهیه گردید. سری رقت ۱۰/۰۰ تا ۰/۱۶ میلی گرم در میلی لیتر از عصاره ها در آب مقطر آماده گردید. اثر ضد میکروبی عصاره ها بر رشد استرپتوکوکوس موتانس به روش انتشار چاهک و فعالیت ضد بیوفیلمی عصاره ها به روش میکرودايلوشن با رنگ تنفسی TTC انجام گردید. مقایسه میانگین ها با آزمون آنالیز واریانس انجام شد.

یافته ها: عصاره های متانولی، اتانولی و استونی گال مازو خاصیت ضد باکتریایی بر علیه استرپتوکوکوس موتانس از خود نشان دادند. حداقل غلظت مهارکننده عصاره ها بین ۱۶۰ تا ۳۲۰ میکروگرم در میلی لیتر و حداقل غلظت کشنده آن ها ۳۲۰ تا ۶۴۰ میکروگرم در میلی لیتر به دست آمد. عصاره آبی گال مازو فعالیت ضد میکروبی نشان نداد. عصاره های گال مازو در غلظت های بالاتر از ۱۹/۵ میکروگرم در میلی لیتر مانع از تشکیل بیوفیلم استرپتوکوکوس موتانس شد.

استنتاج: عصاره های گال مازو مانع از رشد استرپتوکوکوس موتانس شدند. این عصاره ها در ممانعت از تشکیل بیوفیلم استرپتوکوکوس موتانس بسیار مؤثر هستند. گال های مازو عوامل ضد میکروبی بالقوه مناسبی محسوب می شوند.

واژه های کلیدی: استرپتوکوکوس موتانس، پلاک دندانی، عصاره گیاهی، فعالیت ضد باکتریایی، گال بلوط

مقدمه

پوسیدگی دندان و بیماری های پرودنتال ناشی از فعالیت گونه های مختلف باکتری های دهان است. پلاک دندانی اپیدمی خفیف ولی بسیار رایج در سطح جهان است و در همه اقشار جامعه و همه سنین مشاهده می شود. پلاک دندان، یکی از مهم ترین عوامل ایجاد پوسیدگی دندان است. علاوه بر پوسیدگی، در صورت

E-mail: mohamadi_m@iaufala.ac.ir

مؤلف مسئول: مریم محمد سیچانی - اصفهان: فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، گروه میکروبیولوژی

۱. مربی، گروه میکروبیولوژی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران

۲. استادیار، گروه میکروبیولوژی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران

۳. کارشناس ارشد میکروبیولوژی، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۴/۲۹ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۳/۵/۱۴ تاریخ تصویب: ۱۳۹۳/۱۱/۵

می‌گردد (۱). امروزه محققین برای پیدا کردن پتیدها از گیاهان و حیوانات تلاش می‌کنند تا تنها باکتری‌های تولیدکننده اسید در دهان را مهار کنند (۷).

درخت بلوط دارمازو از جنس *Quercus*، تیره *Fagaceae* و از راسته *Fagales* می‌باشد. جنگل‌های استان‌های آذربایجان غربی، کردستان، کرمانشاه و لرستان اصلی‌ترین رویشگاه‌های بلوط به شمار می‌روند (۸). در قسمت‌هایی از شاخه‌های درخت بلوط تظاهرات رشدی غیر معمولی مشاهده می‌شود که گال نام دارد. گال می‌تواند در اثر افزایش تعداد (هیپرپلازی) یا اندازه (هیپرتروفی) سلول‌های گیاهی در محل گال به وجود آید. گروهی نیز گال‌ها را بافت‌های گیاهی تغییر شکل یافته‌ای می‌دانند که توسط موجودات گالزا ایجاد شده و وظیفه تهیه غذا برای لاروهای موجود و حفاظت از آن‌ها را در مقابل صدمات فیزیکی و شرایط نامناسب محیطی بر عهده دارند (۹، ۱۰).

عامل مولد گال مازو زنبوری است متعلق به خانواده *Cynipidae* و زیرخانواده *Cynipinae* و از طایفه *Cynipini* به نام *Andricus sternlichti* که فقط ماده‌های غیرجنسی آن تا به حال توصیف شده‌اند. این زنبور قادر است روی جوانه‌های جانبی و انتهایی شاخه‌های درختان دارمازو گال‌هایی ایجاد نمایند. گال مازو کروی شکل بوده و در سطح خارجی آن برجستگی‌های کوچک مشاهده می‌شود. قطر نهایی گال مازو به ۲۰ تا ۳۰ میلی‌متر می‌رسد. گال مازو بیش از ۶۵ درصد تانن دارد که باعث شده ارزش اقتصادی زیادی داشته باشد. تانن‌ها، پلی‌فنل‌های گیاهی با وزن مولکولی بالا هستند که از نظر شیمیایی و زیستی به دو گروه مشخص تقسیم می‌شوند: تانن‌های متراکم (پروآنتوسیانیدین‌ها) و تانن‌های قابل هیدرولیز (الاجی تانن‌ها و گالوتانن‌ها). تانن از طریق گروه‌های هیدروکسیل و کربوکسیل فراوان قابلیت اتصال به ترکیبات پروتئینی را داشته و فعالیت ضد میکروبی مناسبی در بعضی از مواد غذایی از خود نشان می‌دهد (۱۱-۱۳). گال مازو علاوه بر تانن حاوی

تجمع پلاک روی دندان و حذف نشدن آن التهاب لثه شروع شده و در اثر پیشرفت بیماری، تخریب استخوان آلونل، سست شدن دندان و در نهایت از دست رفتن دندان‌ها اتفاق خواهد افتاد. پلاک‌دندانی، نوعی بیوفیلم میکروبی است که توسط میکروارگانیسم‌های فلور طبیعی دهان ایجاد می‌شوند. فعل و انفعالات بین سلولی باکتری‌ها با یکدیگر در فلور دهان و تأثیر آن‌ها بر اتصال باکتری‌ها روی سطوح باعث شروع و شکل‌گیری بیوفیلم می‌شود (۱، ۲).

با توجه به گستردگی زیاد پوسیدگی دندان، مطالعات زیادی برای حذف و جلوگیری از عوارض آن در دنیا صورت گرفته است. مطالعات اخیر نشان دهنده استفاده از ترکیبات مختلفی از جمله آنتی‌بیوتیک‌های پیشگیری‌کننده، پتیدهای ضدباکتریایی، واکسن‌ها، پروبیوتیک‌ها، شیرین‌کننده‌های جایگزین ساکارز، ترکیبات ضدپوسیدگی دندان مثل فلوراید، کازئین و فسفوپتیدها به عنوان مواد ضدپلاک‌دندانی است. آنتی‌بیوتیک‌هایی مانند پنی‌سیلین و وانکومایسین نیز از تشکیل پلاک دندان جلوگیری می‌کنند. مواد کاتیونیک مثل کلروهگزیدین و ستیل پیریدینیوم کلراید و مواد مشتق شده از گیاهان مثل عصاره سانگویناریا، مواد آنیونی مثل سدیم دودسیل سولفات (SDS) و مواد غیر یونی مثل تریکلوزان، به طور عمده در دهان شویه‌ها و خمیر دندان‌ها استفاده می‌شود (۳-۶).

استرپتوکوکوس موتانس از باکتری‌های شاخص دهانی است که در تشکیل پلاک دندان نقش مهمی دارد. این گونه باکتریال طریق متابولیزه کردن کربوهیدرات‌های مختلف محیط اسیدی ایجاد می‌کند. گلوکان خارج سلولی سنتز شده توسط باکتری‌ها با ایجاد امکان اتصال روی مینای دندان، باعث تجمع استرپتوکوکوس‌های بومی روی سطح دندان‌ها می‌شود و با همراهی سایر میکروارگانیسم‌ها در توسعه ماتریکس پلی‌ساکاریدی خارج سلولی، جرم ایجاد شده به صورت بیوفیلم دندانی تحت عنوان پلاک‌دندانی تشکیل

مقادیری اسید گالیک، اسید سیرینژیک، بتاسیتوسترول، آنتوفلاون‌هگزامتیل، آتوسیانین و متیل بتولات است (۱۴). تاکنون هیچ‌گونه کاربرد محلی یا استفاده از آن در طب سنتی به شکل دهان شویه مستند نشده است. وجود ترکیبات فعال متعدد در گال مازو اثرات ضدباکتریایی آن را توجیه می‌کند. لیکن در مورد اثر ضدبیه‌فیلمی مواد فعال گال مازو تحقیقی انجام نشده است. لذا با توجه به نقش بیوفیلم/ستریتوکوکوس موتانس در ایجاد آسیب و پوسیدگی‌های دندان، هدف از این مطالعه بررسی آزمایشگاهی تأثیر عصاره‌های آبی، اتانولی، متانولی و استونی گال مازو بر رشد و تشکیل بیوفیلم ناشی از استریتوکوکوس موتانس می‌باشد.

مواد و روش‌ها

الف) تهیه گال‌های مازو و عصاره‌گیری

گال‌ها در اواخر تابستان سال ۱۳۹۰ از رویشگاه درختان دارمازو (*Quercus infectoria*) واقع در استان لرستان جمع‌آوری شدند. شناسایی و تأیید گال مازو توسط هرباریوم گیاه‌شناسی جهاد کشاورزی استان لرستان انجام شد. ابتدا گال‌ها جهت آلودگی زدایی سطحی با محلول هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد شستشو شده و پس سه بار آبکشی با آب مقطر استریل در سایه خشک شدند. گال‌ها پودر شدند و تا زمان آزمایش دور از نور و در یخچال قرار گرفتند (۱۵).

عصاره‌گیری به دو روش خیساندن و سوکسله انجام شد. به منظور دستیابی به یک عصاره طبیعی با میزان مواد موثره یکنواخت، عصاره آبی به روش خیساندن تهیه شد. در روش خیساندن، ۵۰ گرم از پودر گال مازو در ارلن حاوی ۲۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل ریخته شد و مدت ۳ تا ۵ روز روی شیکر ۱۵۰ دور در دقیقه در دمای محیط، قرار داده شد. سپس عصاره صاف گردید. برای تهیه عصاره‌های اتانولی، متانولی و استونی از روش سوکسله استفاده شد. ۵۰ گرم پودر گال مازو همراه با ۱۰۰ میلی‌لیتر حلال مورد نظر در دستگاه سوکسله به

مدت ۲ ساعت عصاره‌گیری شد. عصاره‌ها در دستگاه روتاری اوپراتور (مدل STEROGLOSS/202، ایتالیا) در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد خشک و به صورت پودر آماده شدند. با حل نمودن ۰/۱ گرم از عصاره گال در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل سری رقت‌های مختلف با غلظت نهایی ۱۰، ۵، ۲/۵۰، ۱/۲۵، ۰/۶۳، ۰/۳۱ و ۰/۱۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تهیه شد. تمامی غلظت‌های آماده شده تا زمان اجرای آزمایش در یخچال نگهداری شدند (۱۶).

ب) بررسی فعالیت ضد باکتریایی عصاره‌ها به روش انتشار در آگار

کشت میکروبی استاندارد استریتوکوکوس موتانس (ATCC: 25923) از مؤسسه تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه تهران به شکل لیوفیلیزه خریداری و مطابق با روش استاندارد احیاء شد. از سوسپانسیون تازه و جوان (کشت ۲۴-۱۸ ساعته) استریتوکوکوس موتانس در سرم فیزیولوژی استریل کدورت معادل نیم مک فارلند تهیه گردید. به منظور اطمینان از کدورت سوسپانسیون باکتری، میزان جذب سوسپانسیون در دستگاه اسپکتروفتومتر (UNIC-UV-2100، امریکا)، در طول موج ۶۳۰ در محدوده ۰/۸ تا ۰/۱ تنظیم گردید. این سوسپانسیون به نسبت ۰/۱ رقیق گردید تا در نهایت رقت $10^7 \times 1/5$ CFU/ml از باکتری به دست آمد.

صد میکرولیتر از سوسپانسیون رقیق شده استریتوکوکوس موتانس روی محیط کشت BHI آگار (Merck، آلمان) تلقیح و با سواب استریل به صورت کاملاً یکنواخت کشت داده شد. سپس چاهک‌هایی به قطر ۶ میلی‌متر روی محیط‌های کشت ایجاد گردید. از هر رقت تهیه شده از عصاره ۱۰۰ میکرولیتر در چاهک ریخته شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. قطر هاله عدم رشد با خط کش اندازه‌گیری شد. آزمون‌ها در شرایط کاملاً آسپتیک ۳ بار تکرار شدند. با توجه به این‌که عصاره‌ها در آب مقطر استریل حل شده بود، از ۱۰۰ میکرولیتر

آب مقطر استریل به عنوان کنترل منفی آزمایش و از دیسک ۱۰ میکروگرمی پنی سیلین (پادتن طب، ایران) برای کنترل مثبت استفاده شد (۱۵). به منظور تعیین MIC (حداقل غلظت مهارکنندگی) و MBC (حداقل غلظت کشندگی) عصاره‌های گال مازو از روش ماکروداپلوشن استفاده شد (۱۷). به منظور انجام آزمون حذف بیوفیلم و ممانعت از تشکیل بیوفیلم از غلظت‌هایی کم‌تر از میزان MIC استفاده شد.

ج) آزمون حذف بیوفیلم استریتوکوکوس موتانس به روش میکروپلیت

کشت تازه ۲۴-۱۸ ساعته از استریتوکوکوس موتانس با کدورت معادل لوله ۰/۵ استاندارد مک فارلند در محیط کشت BHI broth (Merck، آلمان) تهیه شد. ۲۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی تهیه شده به هر یک از چاهک‌های ۹۶ خانه‌ای میکروپلیت ته صاف مخصوص کشت بافت اضافه شد. میکروپلیت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد قرار گرفت. پس از ۲۴ ساعت ۱۰۰ میکرولیتر از محتویات هر چاهک تخلیه و ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت BHI برات حاوی ۱ درصد گلوکز تازه به هر چاهک اضافه شد. این کار برای سه روز متوالی انجام گردید. پس از گذشت سه روز، میکروپلیت وارونه شد تا همه محتویات چاهک‌ها تخلیه شوند و سه بار با دقت با اضافه نمودن و تخلیه ۲۵۰ میکرولیتر بافر فسفات‌شسته داده شدند. سپس ۲۵۰ میکرولیتر از رقت‌های مختلف عصاره به هر چاهک اضافه شد. ستون شماره ۱۲ به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد و به هر یک از چاهک‌های آن ۲۵۰ میکرولیتر محیط کشت BHI برات استریل اضافه شد. پس از یک ساعت محتویات چاهک‌ها با وارونه کردن آن‌ها خالی شد (۱۸، ۷، ۴).

به منظور بررسی وجود یا تخریب بیوفیلم تولید شده توسط استریتوکوکوس موتانس از تری فنیل تترازولیوم کلراید (Triphenyl tetrazolium chloride) استفاده شد. تری فنیل تترازولیوم کلراید یک رنگ تنفسی

است. باکتری‌های فعال و زنده به کمک آنزیم هیدروژناز خود تری فنیل تترازولیوم کلراید را به نمک‌های فورمازان احیاء می‌نمایند که رنگ قرمز دارند (۱۹). پس از تخلیه چاهک‌ها به هر کدام ۲۰۰ میکرولیتر محلول ۰/۲ درصد TTC اضافه شد و میکروپلیت به مدت ۲ ساعت در محیط ۳۷ درجه سانتی گراد گذاشته شد. بعد از ۲ ساعت چاهک‌ها با بافر فسفات‌شسته شدند. سپس ۲۰۰ میکرولیتر اسید استیک گلاسیال ۳۳ درصد به هر چاهک اضافه شد و میکروپلیت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد گذاشته شد. پس از گذشت ۱۵ دقیقه میکروپلیت‌ها به خوبی تکان داده شد و جذب نوری آن‌ها در دستگاه الیزایدر (Biotek، امریکا) در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد. از کلر هگزیدین ۱۲/۰ درصد که یک ترکیب ضد میکروبی مؤثر بر استریتوکوکوس موتانس است به عنوان کنترل مثبت استفاده شد (۲۰-۲۲).

کارایی عصاره‌های اتانولی، متانولی و استونی گال مازو در حذف بیوفیلم استریتوکوکوس موتانس بر اساس فرمول تعیین کارایی بیوسایدها به واسطه تعیین درصد کاهش بیوفیلم مطابق با فرمول زیر محاسبه گردید (۲۳-۲۵).

$$\text{درصد کاهش بیوفیلم} \times \left\{ \frac{(C-B)-(T-B)}{C-B} \right\} = 100$$

در فرمول C میانگین جذب چاهک‌های کنترل، B میانگین جذب چاهک‌های کنترل منفی و T میانگین جذب چاهک‌های آزمون محاسبه شده است. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده نرم افزار آماری SPSS ویرایش هجدهم انجام شد. به منظور دستیابی به نتایج آماری دقیق‌تر هر آزمون با سه بار تکرار انجام شد و از آزمون آنالیز واریانس برای مقایسه میانگین‌ها استفاده گردید و اختلاف بین گروه‌ها در سطح معنی‌دار کم‌تر از ۰/۰۰۱ تعیین شد.

یافته‌ها

نتایج حاصل از آزمون بررسی فعالیت ضدباکتریایی عصاره‌های آبی، اتانولی، متانولی و استونی گال مازو

بر علیه استرپتوکوکوس موتانس در جدول شماره ۱ نشان داده شده است.

جدول شماره ۱: میانگین قطر هاله عدم رشد در غلظت های مختلف عصاره گال مازو بر استرپتوکوکوس موتانس (mm)

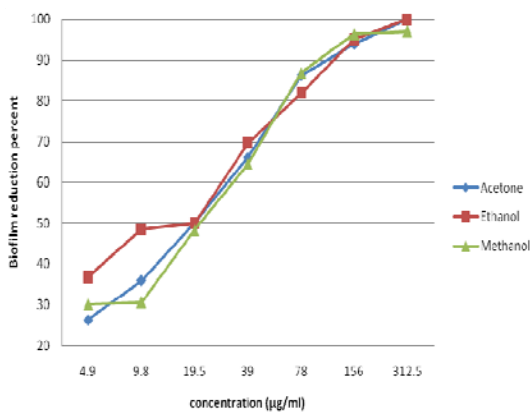
غلظت (میلی گرم بر میلی لیتر)	نوع عصاره	
	اتانولی	استونی
۱۰/۰۰	۲۲/۶۷±۰/۵۸	۲۲/۳۳±۱/۱۵
۵/۰۰	۲۰/۰۰±۱/۰۰	۲۱/۳۳±۱/۱۵
۲/۵۰	۱۸/۰۰±۱/۰۰	۱۹/۰۰±۱/۰۰
۱/۲۵	۱۵/۶۷±۰/۵۸	۱۷/۰۰±۱/۰۰
۰/۶۳	۱۳/۰۰±۱/۰۰	۱۵/۳۳±۰/۵۸
۰/۳۱	۱۱/۰۰±۱/۰۰	۱۲/۶۶±۰/۵۸
۰/۱۶	۸/۶۷±۰/۵۸	۹/۳۳±۱/۱۵

آزمون آنالیز واریانس یک طرفه نشان داد که میانگین قطر هاله عدم رشد در غلظت های مشابه از عصاره متانولی، اتانولی و استونی گال مازو تفاوت معنی داری ندارد ($p < 0/001$). همچنین آزمون آماری تعقیبی توکی نیز نشان داد که میانگین قطر هاله عدم رشد در غلظت های مشابه از عصاره متانولی با اتانولی مازو تفاوت معنی داری ندارد ($p < 0/001$). نتایج این آزمون در مورد عصاره های اتانولی و استونی، همچنین عصاره اتانولی و استونی مشابه بود. عصاره آبی گال مازو در هیچ یک از غلظت های مورد آزمایش، فعالیت ضد میکروبی نشان نداد. آزمون آنالیز واریانس یک طرفه نشان داد که میانگین قطر هاله عدم رشد در غلظت های گوناگون عصاره متانولی، اتانولی و استونی گال مازو با غلظت های مشابه از عصاره آبی تفاوت معنی داری دارد ($p < 0/001$). نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل های آماری افزایش قطر هاله عدم رشد ناشی از غلظت های مختلف عصاره های متانولی، اتانولی و استونی گال ها را با غلظت آن عصاره در ارتباط نشان می دهند ($p < 0/001$). در واقع با افزایش غلظت عصاره، قطر هاله عدم رشد نیز افزایش می یابد. میانگین قطر هاله عدم رشد برای دیسک ۱۰ میکرو گرمی پنی سیلین $14/63 \pm 1/10$ به دست آمد. داده های جدول شماره ۱ و تجزیه و تحلیل های حاصل از آزمون های آماری نشان داد که هیچگونه اختلاف

معنی داری بین میانگین قطر هاله عدم رشد حاصل از عصاره های اتانولی، متانولی و استونی گال مازو وجود ندارد ($p < 0/001$). حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC) عصاره اتانولی و متانولی گال مازو $320 \mu\text{g/ml}$ و حداقل غلظت کشندگی (MBC) آن $640 \mu\text{g/ml}$ به دست آمد. مقادیر MIC و MBC عصاره استونی به ترتیب 160 و 320 میکرو گرم بر میلی لیتر بود.

ارزیابی کشته شدن سلول های استرپتوکوکوس موتانس ایجاد کننده بیوفیلم توسط غلظت های مختلف کم تر از میزان کشنده عصاره های گوناگون گال های مورد آزمایش به کمک رنگ تنفسی تری فنیل تترازولیوم کلراید گویای این مطلب است غلظت های مختلف عصاره های اتانولی، متانولی و استونی گال مازو در ممانعت از تشکیل بیوفیلم استرپتوکوکوس موتانس کارایی متفاوتی دارند.

نمودار شماره ۱ نشان می دهد در غلظت های کم تر از $19/5$ میکرو گرم در میلی لیتر از هر سه نوع عصاره آزمایش شده کم تر از 50 درصد در حذف بیوفیلم تأثیر داشتند. لیکن با افزایش غلظت عصاره ها از $19/5$ میکرو گرم در میلی لیتر تا $312/5$ میکرو گرم در میلی لیتر بیوفیلم استرپتوکوکوس موتانس حذف گردید. در غلظت $312/5$ میکرو گرم در میلی لیتر بیوفیلم استرپتوکوکوس موتانس 100 درصد حذف شد. کلر



نمودار شماره ۱: درصد کاهش بیوفیلم استرپتوکوکوس موتانس در حضور غلظت های مختلف از عصاره های گال مازو

هگزیدین به عنوان کنترل مثبت آزمایش از تشکیل بیوفلم به طور کامل ممانعت کرد. از آنجایی که عصاره آبی گال مازو هیچگونه اثر ضدباکتریایی بر *استرپتوکوکوس موتانس* نداشت اثر ضدبیوفیلمی آن بررسی نشد.

بحث

کنترل پلاک دندان به لحاظ جلوگیری از تخریب دندان، بیماری‌های پرودنتال و زیبایی دندان‌ها حائز اهمیت است (۲۶، ۲۷). با توجه به تحقیقات بسیار درباره اثرات ضد میکروبی مشاهده شده از گال‌های گیاهی و کاربردهای گوناگون دارویی آن‌ها که باعث افزایش ارزش اقتصادی آن‌ها شده است، در این تحقیق فعالیت ضدبیوفیلمی عصاره‌های مختلف گال مازو مورد بررسی قرار گرفت و تأثیر این عصاره‌ها بر روی رشد و تشکیل بیوفلم ناشی از *استرپتوکوکوس موتانس* به عنوان عامل اصلی مولد پلاک دندان تحت شرایط آزمایشگاهی ارزیابی شد.

نتایج به دست آمده نشان داد که غلظت‌های ۶۳۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از عصاره‌های متانولی، اتانولی و استونی گال مازو با ایجاد هاله عدم رشدی در محدوده ۱۳ تا ۱۵ میلی‌متر تأثیر ضد میکروبی مناسبی بر علیه *استرپتوکوکوس موتانس* داشت. هاله عدم رشد بدست آمده در این غلظت از عصاره‌ها با هاله ایجاد شده توسط دیسک پنی‌سیلین ۱۰ میکروگرمی که به عنوان شاهد استفاده شده بود، قابل مقایسه است. همانگونه که یافته‌ها نشان داد غلظت‌های بیش از ۶۳۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره‌های گال مازو، هاله عدم رشدی در محدوده ۱۳ تا ۲۲ میلی‌متر ایجاد کردند که این نشانه خاصیت ضد میکروبی مناسب این عصاره‌ها می‌باشد. مقایسه هاله عدم رشد عصاره‌های متانولی، اتانولی و استونی گال مازو نشان داد که در غلظت‌های یکسان از هر عصاره، هاله عدم رشد ناشی از عصاره استونی بیش‌تر از دو عصاره دیگر است. این مسئله احتمالاً به دلیل ترکیبات فعال خاصی است که در عصاره استونی استخراج شده

است و نشان دهنده این مطلب است که احتمالاً مواد مؤثره موجود در گال ماهیت‌های شیمیایی مختلفی داشته که به واسطه حلال‌های آلی گوناگون قابل جداسازی می‌باشند. با این وجود تجزیه و تحلیل‌های آماری اختلاف بین میانگین قطر هاله عدم رشد مشاهده شده بین این سه نوع عصاره را معنادار نشان نداد. به منظور نتیجه‌گیری و قضاوت قطعی در این مورد لازم است تا هر یک از مواد مؤثره و مقادیر موجود در هر یک از عصاره‌ها در مطالعات آتی سنجیده شوند. در تحقیق مشابهی که توسط Vermani و همکارانش انجام شد، اثر ضدباکتریایی عصاره گال‌های *Q. infectoria* ایجاد شده توسط زنبور گالزای *Adleria gallae-tinctoria* بر تعدادی از باکتری‌های بیماری‌زای دهان مورد بررسی قرار گرفت. داده‌ها نشان داد که بیش‌ترین تأثیر ضد میکروبی عصاره گال بلوط به ترتیب بر *استافیلوکوکوس آرتوس*، *استرپتوکوکوس موتانس* و *استرپتوکوکوس سالیاریوس* بوده است. آن‌ها همچنین گزارش کردند که تأثیر عصاره متانولی بیش‌تر از سایر عصاره‌های مورد بررسی‌شان بوده است (۲۸).

Basri و همکارانش نیز در مطالعه‌ای که روی خاصیت ضدباکتریایی گال‌های *Q. infectoria* داشتند، تأثیر عصاره گال‌ها را بر باکتری‌های عامل پوسیدگی دندان و بیماری‌های پرودنتال بررسی نمودند. آن‌ها اعلام کردند که عصاره‌های متانولی و استونی، اثر ضد میکروبی مشابهی بر باکتری‌های گرم مثبت مورد آزمایش آن‌ها از جمله *استرپتوکوکوس موتانس* و *استرپتوکوکوس سالیاریوس* داشتند که کاملاً با نتایج این تحقیق منطبق می‌باشد. در تحقیق Basri مقادیر MIC و MBC عصاره‌های متانولی و استونی به ترتیب در محدوده ۰/۱۶ تا ۰/۶۳ و ۱/۲۵ تا ۲/۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر گزارش شده است که این مقادیر بسیار بالاتر از مقادیر MIC و MBC به دست آمده در تحقیق حاضر می‌باشد. همچنین مقادیر MIC و MBC عصاره‌های مختلف گال مازو در این تحقیق بسیار کم‌تر از نتایج

ارائه شده در تحقیق Basri است. در مطالعه Basri حداقل غلظت بازدارنده عصاره‌های متانولی و استونی ۰/۶۳ میلی گرم بر میلی لیتر گزارش شده‌اند (۲۹). این اختلاف ممکن است به نوع گال مورد بررسی مربوط باشد زیرا ترکیبات موجود در گال تحت تأثیر نوع، منطقه و زنبور گالزا تفاوت دارد. متأسفانه در تحقیق Basri به نوع گال یا زنبور ایجادکننده آن اشاره‌ای نشده است. از جمله نتایج حاصل از تحقیق حاضر این است که عصاره آبی تهیه شده از گال طی چندین بار عصاره‌گیری اثر ضد میکروبی از خود نشان نداد. این در حالی است که Basri در تحقیق دیگری که نتایج آن را در سال ۲۰۰۴ منتشر کرده است تأثیر عصاره‌های استونی و آبی گال‌های *Q. infectoria* را بر استافیلوکوکوس آرتروس یکسان گزارش کرده است. او که در این تحقیق اثر مهارکنندگی عصاره‌های استونی و آبی گال را بر روی *سالمونلا تیفی موربوم* به عنوان نماینده باسیل‌های گرم منفی و استافیلوکوکوس آرتروس به عنوان یک باکتری گرم مثبت آزمایش کرد، حداقل غلظت کشندگی عصاره آبی گال بر روی این دو باکتری را به ترتیب ۲/۵ و ۰/۳۱ میلی گرم بر میلی لیتر گزارش کرد (۳۰). کرباسی‌زاده و همکاران نیز در مطالعه‌ای اثر ضدباکتریایی عصاره آبی گال‌های قلفاف (ناشی از فعالیت زنبور *Andricus quercustozae*) و مازو را بر باسیل‌های گرم منفی با مقاومت آنتی‌بیوتیکی چندگانه مورد بررسی قرار دادند. نتایج آن‌ها نشان داد عصاره‌های آبی با حداقل MIC، ۰/۱۲۸ میلی گرم بر میلی لیتر می‌تواند از رشد *سودوموناس آئروژینوزا*، *اسینتوباکتر بومانی* و *اشرشیا کلی* ممانعت به عمل آورد (۳۱). با توجه به این که روش عصاره‌گیری در هر دو مطالعه خیساندن بوده است، این اختلاف احتمالاً به نوع ترکیبات تشکیل‌دهنده دیواره باکتری مربوط می‌شود. *سودوموناس آئروژینوزا*، *اسینتوباکتر بومانی* و *اشرشیا کلی* از باسیل‌های گرم منفی می‌باشند و ساختار دیواره‌شان با دیواره *استرپتوکوکوس موتانس* کاملاً تفاوت دارد.

در مورد اثرات ضدبیه‌فیلمی گال‌های بلوط مطالعات منتشر شده زیادی در دسترس نمی‌باشد. Chusri و همکارانش اثر ضدبیه‌فیلمی عصاره اتانولی گال بلوط را در مقایسه با اسید تانیک بر روی ۶ ایزوله حساس به متی‌سیلین و ۶ ایزوله مقاوم به متی‌سیلین *استافیلوکوکوس اورئوس* بررسی کردند. آن‌ها گزارش نمودند که عصاره اتانولی گال بلوط در غلظت‌های کم‌تر از MIC، تولید بیوفیلم را در تمامی ایزوله‌های مقاوم به متی‌سیلین مهار می‌کند (۳۲). میزان MIC بدست آمده در مطالعه Chusri ۲۵۰ میکروگرم در میلی لیتر است که تقریباً نزدیک به این میزان در مطالعه حاضر می‌باشد (MIC=۳۲۰). در مطالعه حاضر آزمون حذف بیوفیلم توسط عصاره گال که به روش میکروداپلوشن انجام شد، نشان داد که باکتری‌های موجود در بیوفیلم در اثر مجاورت با غلظت‌های بالاتر از ۱۹/۵ میکروگرم در میلی لیتر کاملاً قابلیت حیات و تولید بیوفیلم خود را از دست می‌دهند. درصد کاهش حذف بیوفیلم *استرپتوکوکوس موتانس* بطور مشابهی در هر سه عصاره با افزایش غلظت رابطه مستقیم دارد، به گونه‌ای که تشکیل بیوفیلم مطابق با نمودار ۱ در غلظت‌های بالاتر از ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر از عصاره‌های اتانولی، متانولی و استونی بیش‌تر از ۹۰ درصد کاهش می‌یابد. با توجه به شیوع بیماری‌های دهان و دندان و هزینه‌های سنگین درمان این بیماری‌ها پیشگیری از این عفونت‌ها معقول و منطقی به نظر می‌رسد. در این راستا خاصیت ضدباکتریایی و ضدبیه‌فیلمی مشاهده شده از عصاره گال مازو *Quercus infectoria* بر *استرپتوکوکوس موتانس* کاربرد این عصاره‌های گیاهی در ترکیب دهان‌شویه‌ها پس از انجام کارآزمایی‌های بالینی می‌تواند پیشنهاد شود.

سپاسگزاری

این مقاله بخشی از طرح پژوهشی به شماره ۳۰۱/۲۸۱۴۴ مورخ ۱۳۹۰/۹/۲۱ مصوب شورای

و تمامی کسانی که در اجرای این پژوهش ما را یاری نمودند سپاسگزاری می کنند.

پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی فلاورجان است. بدین وسیله نویسندگان مقاله از معاونت محترم و اعضای شورای پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان

References

1. Ahn SJ, Ahn SJ, Wen ZT, Brady LJ, Burne RA. Characteristics of Biofilm Formation by *Streptococcus mutans* in the Presence of Saliva. *Infect Immun* 2008; 76(9): 4259-4268.
2. Takahashi N, Nyvad B. The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. *J Dent Res* 2011; 90(3): 294-303.
3. Kanthawong S, Bolscher J, Veerman E, van Marle J, de Soet H, Nazmi K, et al. Antimicrobial and antibiofilm activity of LL-37 and its truncated variants against *Burkholderia pseudomallei*. *Inter J Antimicrob Agents* 2012; 39(1): 39-44.
4. Viju N, Satheesh S, Vincent SGP. Antibiofilm activity of coconut (*Cocos nucifera* Linn.) husk fibre extract. *Saudi J Biol Sci* 2013; 20(1): 85-91.
5. Chen F, Wang D. Novel technologies for the prevention and treatment of dental caries: a patent survey. *Expert Opin Ther Pat* 2010; 20(5): 681-694.
6. Coenye T, Honraet K, Rigole P, Jimenez PN, Nelis HJ. In Vitro Inhibition of *Streptococcus mutans* Biofilm Formation on Hydroxyapatite by Subinhibitory Concentrations of Anthraquinones. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51(4): 1541-1544.
7. Budzynska A, Wieckowska-Szakiel M, Sadowska B, Kalemba D, Rozalska B. Antibiofilm activity of selected plant essential oils and their major components. *Pol J Microbiol* 2011; 60(1): 35-41.
8. Sadeghi S, Melika G, Pujade-Villar J, Penzes Z, Acs Z, Bechtold M, et al. Oak cynipid gall inquilines of Iran (Hym.:Cynipidae: Synergini), with description of new species. *J Entomol Soc Iran* 2006; 25(2): 15-50 (Presian).
9. Yousef Elahi M, Rouzbehan Y. Characterization of *Quercus persica*, *Quercus infectoria* and *Quercus libani* as ruminant feeds. *Anim Feed Sci Tech* 2008; 140(1-2): 78-89.
10. Schönrogge K, Walker P, Crawley MJ. Parasitoid and inquiline attack in the galls of four alien, cynipid gall wasps: host switches and the effect on parasitoid sex ratios. *Ecol Entomol* 2000; 25(2): 208-219
11. Voon HC, Bhat R, Rusul G. Flower Extracts and Their Essential Oils as Potential Antimicrobial Agents for Food Uses and Pharmaceutical Applications. *Compre Rev Food Sci Food Safe* 2012; 11(1): 34-55
12. Dar MS, Ikram M, Fakouhi T. Pharmacology of *Quercus infectoria*. *J Pharm Sci* 1976; 65(12): 1791-1794.
13. Hamid H, Kaur G, Abdullah S, Ali M, Athar M, Alam M. Two New Compounds from the Galls of *Quercus infectoria* with Nitric Oxide and Superoxide Inhibiting Ability. *Pharma Biol* 2005; 43(4): 317-323.
14. Fölster-Holst R, Latussek E. Synthetic Tannins in Dermatology—A Therapeutic Option in a Variety of Pediatric Dermatoses. *Pediatr Dermatol* 2007; 24(3): 296-301.
15. Muskhazli M, Nurhafiza Y, Nor Azwady AA, Nor Dalilah E. Comparative Study on the in vitro Antibacterial Efficacy of Aqueous and Methanolic Extracts of *Quercus infectoria* Gall's Against *Cellulosimicrobium*

- cellulans. *J Biol Sci* 2008; 8(3): 634-638.
16. Voravuthikunchai SP, Kitpipit L. Activity of medicinal plant extracts against hospital isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11(6): 510-512.
 17. Wiegand I, Hilpert K, Hancock RE. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protoc* 2008; 3(2): 163-175.
 18. Taweechaisupamong S, Ngaonee P, Patsuk P, Pitiphat W, Khunkitti W. Antibiofilm activity and post antifungal effect of lemongrass oil on clinical *Candida dubliniensis* isolate. *South African J Botany* 2012; 78: 37-43.
 19. Pan B, Huang R, Zheng L, Chen C, Han S, Qu D, et al. Thiazolidione derivatives as novel antibiofilm agents: Design, synthesis, biological evaluation, and structure–activity relationships. *Eur J Med Chem* 2011; 46(3): 819-824.
 20. Issac Abraham SV, Palani A, Ramaswamy BR, Shunmugiah KP, Arumugam VR. Antiquorum Sensing and Antibiofilm Potential of *Capparis spinosa*. *Arch Med Res* 2011; 42(8): 658-668.
 21. Saharkhiz MJ, Motamedi M, Zomorodian K, Pakshir K, Miri R, Hemyari K. Chemical Composition, Antifungal and Antibiofilm Activities of the Essential Oil of *Mentha piperita* L. *ISRN Pharm* 2012; (2090-6153). 2013; 1-6.
 22. Packiavathy IA, Priya S, Pandian SK, Ravi AV. Inhibition of biofilm development of uropathogens by curcumin-An anti-quorum sensing agent from *Curcuma longa*. *Food Chem* 2012; 148: 453-460.
 23. Dong L, Tong Z, Linghu D, Lin Y, Tao R, Liu J, et al. Effects of sub-minimum inhibitory concentrations of antimicrobial agents on *Streptococcus mutans* biofilm formation. *Inter J Antimicrob Agent* 2012; 39(5): 390-395.
 24. Pitts B, Hamilton MA, Zelter N, Stewart PS. A microtiter-plate screening method for biofilm disinfection and removal. *J Microbiol Meth* 2003; 54(2): 269-276.
 25. Trentin DdaS, Giordani RB, Zimmer KR, da Silva AG, da Silva MV, Correia MT, et al. Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. *J Ethnopharmacol* 2011; 137(1): 327-335.
 26. Cardoso Sa N, Cavalcante TT, Araujo AX, Santos HS, Albuquerque MR, Bandeira PN, et al. Antimicrobial and antibiofilm action of Casbane Diterpene from *Croton nepetaefolius* against oral bacteria. *Arch Oral Biol* 2012; 57(5): 550-555.
 27. Pompilio A1, Pomponio S, Di Vincenzo V, Crocetta V, Nicoletti M, Piovano M, et al. Antimicrobial and antibiofilm activity of secondary metabolites of lichens against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from cystic fibrosis patients. *Future Microbiol* 2013; 8(2): 281-292.
 28. Vermani A, Navneet, Prabhat. Screening of *Quercus infectoria* gall extracts as antibacterial agents against dental pathogens. *Indian J Dent Res* 2009; 20(3): 337-339.
 29. Basri DF, Tan LS, Shafiei Z, Zin NM. In Vitro Antibacterial Activity of Galls of *Quercus infectoria* Olivier against Oral Pathogens. *Evid-Based Compl Alt Med* 2012; (2112): 1-6.
 30. Basri DF, Fan SH. The potential of aqueous and acetone extracts of galls of *Quercus infectoria* as antibacterial agents. *Indian J*

- Pharmacol 2005; 37(1): 26-29.
31. Chaharmiri Dokhaharani S, Karbasizadeh V, Mohammadi-Sichani M, Tavakoli M. Antibacterial activity of aqueous extracts of Mazuj and Ghalghaf galls of *Quercus infectoria* in Lorestan forests. *Yafteh* 2013; 15(2): 43-51 (Persian).
32. Chusri S, Phatthalung PN, Voravuthikunchai SP. Anti-biofilm activity of *Quercus infectoria* G. Olivier against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lett Appl Microbiol* 2012; 54(6): 511-517.