Journal of
Babol University of Medical Sciences
مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بابل
e-ISSN: 2251-7170 p-ISSN: 1561-4107

An Investigation of the Antibiofilm and Antibacterial Effects of Ganoderma Lucidum and Nisin Compared with Chlorhexidine Mouthwash on Streptococcus Mutans

F. Mojarad (DDS, MS)[1], M. Y. Alikhani (PhD)[2], F. Daneshyar (DDS, MS)[*1], D. Abedi Firouzjaei (DDS)[*1]

1.Department of Pediatric Dentistry, Faculty of Dentistry, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, I.R.Iran.
2.Infectious Disease Research Center, Avicenna Institute of Clinical Sciences, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, I.R.Iran.

•**Corresponding Author: D. Abedi Firouzjaei (DDS)**
Address: Department of Pediatric Dentistry, Faculty of Dentistry, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, I.R.Iran.
Tel: +98 (81) 38381059. **E-mail:** abedidelaram@yahoo.com

Article Type
Research Paper

Received:
Jun 29th 2024
Revised:
Jul 21st 2024
Accepted:
Aug 10th 2024

ABSTRACT

Background and Objective: Various antimicrobial compounds and solutions are used to control oral bacterial infections, especially Streptococcus mutans. Due to their increasing side effects, there is a great deal of interest in using natural substances and antimicrobial peptides to replace chemical drugs. Therefore, the present study was conducted to investigate the antibiofilm and antibacterial properties of Ganoderma lucidum and nisin in comparison with chlorhexidine mouthwash on Streptococcus mutans.

Methods: Streptococcus mutans strain PTCC 1683 was used in this laboratory experiment. Ganoderma lucidum extract and nisin solution were prepared after resuscitation of the standard strain in Brain Heart Infusion (BHI) Broth. Broth microdilution method was used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MCC) of Ganoderma lucidum extract, nisin and chlorhexidine mouthwash. The antibacterial and antibiofilm effect of the combination of Ganoderma lucidum extract and nisin was determined using the checkerboard assay.

Findings: The MIC of Ganoderma lucidum extract and nisin on the standard strain of Streptococcus mutans were reported to be 2.5 mg/ml and 25 µg/ml, respectively, and the MBC of Ganoderma lucidum extract and nisin on the standard strain were reported to be 2.5 mg/ml and 50 µg/ml, respectively. Moreover, this bacterium was sensitive to all dilutions of chlorhexidine mouthwash. The fractional inhibitory concentration index (FICI) did not show a synergistic effect due to the combined use of Ganoderma lucidum extract and nisin (FICI=2). After reducing the concentration of Ganoderma lucidum extract, nisin, and chlorhexidine mouthwash, the ability to inhibit biofilm formation on the studied strain was significantly reduced ($p<0.05$).

Conclusion: The results of this study indicated the antibiofilm and antibacterial effects of Ganoderma lucidum extract and nisin on Streptococcus mutans, but they are less effective compared with chlorhexidine mouthwash.

Keywords: *Ganoderma Lucidum, Nisin, Chlorhexidine, Streptococcus Mutans.*

Cite this article: Mojarad F, Alikhani MY, Daneshyar F, Abedi Firouzjaei D. An Investigation of the Antibiofilm and Antibacterial Effects of Ganoderma Lucidum and Nisin Compared with Chlorhexidine Mouthwash on Streptococcus Mutans. *Journal of Babol University of Medical Sciences*. 2025; 27: e37.

[DOI: 10.22088/jbums.27.1.37]

Copyright © 2024 Babol University of Medical Sciences. Published by Babol University of Medical Sciences. This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/). Noncommercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.

Journal of
Babol University of Medical Sciences
مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بابل
e-ISSN: 2251-7170 p-ISSN: 1561-4107

مقایسه اثر آنتی بیوفیلمی و آنتی باکتریال گانودرما لوسیدوم و نیسین با دهانشویه کلرهگزیدین بر استرپتوکوکوس موتانس

فرزاد مجرد (DDS, MS)[۱]، محمد یوسف علیخانی (PhD)[۲]، فهیمه دانشیار (DDS, MS)[۱]، دلارام عابدی فیروزجائی (DDS)[۱*]

۱. گروه دندانپزشکی کودکان، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
۲. مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی، پژوهشکده علوم بالینی ابن‌سینا، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

نوع مقاله
مقاله پژوهشی

دریافت:
۱۴۰۳/۴/۹
اصلاح:
۱۴۰۳/۴/۳۱
پذیرش:
۱۴۰۳/۵/۲۰

چکیده

سابقه و هدف: برای کنترل عفونت‌های باکتریایی دهان، به ویژه استرپتوکوکوس موتانس، از ترکیبات و محلول‌های ضد میکروبی مختلف استفاده می‌شود. با توجه به افزایش عوارض جانبی آن‌ها، علاقه زیادی به استفاده از مواد طبیعی و پپتیدهای ضد میکروبی برای جایگزینی با داروهای شیمیایی وجود دارد. لذا هدف از این مطالعه، بررسی خاصیت آنتی بیوفیلمی و آنتی باکتریال گانودرما لوسیدوم و نیسین در مقایسه با دهانشویه کلرهگزیدین بر استرپتوکوکوس موتانس می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی آزمایشگاهی، از سویه استرپتوکوکوس موتانس PTCC 1683 استفاده شد. پس از احیای سویه استاندارد در محیط BHI (Brain Heart Infusion Broth) براث، عصاره گانودرما لوسیدوم و محلول نیسین تهیه شد. برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (Minimum Inhibitory Concentration) و حداقل غلظت کشندگی (Minimum Bactericidal Concentration) عصاره گانودرما لوسیدوم، نیسین و دهانشویه کلرهگزیدین از روش براث میکرودایلوشن استفاده گردید. اثر ضد باکتریایی و ضد بیوفیلمی ترکیبی بین عصاره گانودرما لوسیدوم و نیسین با استفاده از روش چکربورد تعیین شد.

یافته‌ها: MIC عصاره گانودرما لوسیدوم و نیسین روی سویه استاندارد استرپتوکوکوس موتانس به ترتیب ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و MBC عصاره گانودرما لوسیدوم و نیسین روی سویه استاندارد به ترتیب ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شد. همچنین این باکتری نسبت به همه رقت‌های دهانشویه کلرهگزیدین حساس بود. در اثر استفاده ترکیبی از عصاره گانودرما لوسیدوم و نیسین شاخص غلظت بازدارندگی کسری (FICI) اثر هم افزایی نشان نداد (FICI=۲). با کاهش غلظت عصاره گانودرما لوسیدوم، نیسین و دهانشویه کلرهگزیدین توانایی مهار تشکیل بیوفیلم بر سویه مورد مطالعه به طور معنی‌داری کاهش یافت ($p<۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه مبین اثر ضدمیکروبی و ضد بیوفیلمی عصاره گانودرما لوسیدوم و نیسین بر استرپتوکوکوس موتانس می‌باشد اما نسبت به دهانشویه کلرهگزیدین اثر کمتری دارند.

واژه‌های کلیدی: گانودرما لوسیدیوم، نیسین، کلرهگزیدین، استرپتوکوکوس موتانس.

استناد: فرزاد مجرد محمد یوسف علیخانی، فهیمه دانشیار، دلارام عابدی فیروزجائی. مقایسه اثر آنتی بیوفیلمی و آنتی باکتریال گانودرما لوسیدوم و نیسین با دهانشویه کلرهگزیدین بر استرپتوکوکوس موتانس. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بابل. ۱۴۰۴؛ ۲۷: e۳۷.

▣ این مقاله مستخرج از طرح تحقیقاتی به شماره ۱۴۰۱۰۹۰۸۷۵۳۲ دانشگاه علوم پزشکی همدان می‌باشد.

* مسئول مقاله: دکتر دلارام عابدی فیروزجائی
آدرس: همدان، دانشگاه علوم پزشکی همدان، دانشکده دندانپزشکی، گروه دندانپزشکی کودکان. تلفن: ۰۸۱-۳۸۳۸۱۰۵۹ رایانامه: abedidelaram@yahoo.com

[DOI: 10.22088/jbums.27.1.37]

مقدمه

پوسیدگی دندان موضوع پیچیده ای است که توسط عوامل متعددی ایجاد می‌شود و یکی از شایع‌ترین اختلالات عفونی در سطح جهان است (۱). مصرف زیاد قند در رژیم غذایی میزبان باعث افزایش باکتری‌های تولید کننده اسید و اسیدوریک از جمله پاتوژن دهانی پوسیدگی زا استرپتوکوک موتانس در ترکیب میکروبی بیوفیلم‌های دندانی می‌شود (۲). از آنجایی که این باکتری آنزیم‌های مختلف، از جمله گلیکوزیل ترانسفرازها را کد می‌کند، که در محیط خارج سلولی ترشح می‌شوند و از ساکارز موجود در مواد غذایی به عنوان سوبسترا برای سنتز گلوکان‌ها استفاده می‌کنند، به عنوان تولید کننده اصلی اگزوپلی ساکاریدها شناخته می‌شود (۳). در نتیجه، مهار تشکیل بیوفیلم ایجاد شده توسط استرپتوکوکوس موتانس برای پیشگیری و مدیریت موثر پوسیدگی دندان ضروری است (۴).

گانودرما لوسیدوم، یک قارچ شناخته شده از خانواده گانودرماتاسه، منبع ارزشمندی برای استخراج چندین ترکیب دارویی ضروری است که در پزشکی سنتی استفاده می‌شوند (۵). گونه‌های گانودرما در بخش بازیدیومایسوتا، کلاس هوموبازیدومیست‌ها و خانواده پلیپوراسئا طبقه بندی می‌شوند (۶). تحقیقات نشان داده است که گانودرما لوسیدوم دارای اجزای شیمیایی متنوعی مانند پلی ساکاریدها، تری ترپنوئیدها، مروترپنوئیدها، آلکالوئیدها و ارگوسترول است (۷). عصاره گانودرما لوسیدوم شامل اسیدهای هیدروکسی بنزوئیک و سینامیک می‌باشد که دارای فعالیت ضدباکتریایی می‌باشد (۸).

نیسین، یک باکتریوسین پلی پپتیدی است که اخیراً به عنوان یک آنتی بیوتیک امیدوارکننده توجه را به خود جلب کرده است (۹). نیسین تنها پپتید ضد میکروبی است که به طور گسترده در نگهداری مواد غذایی به صورت تجاری استفاده می‌شود. نیسین به دلیل غیر سمی بودن، بی طعم بودن، پایداری در برابر حرارت و تحمل pH پایین، رایج‌ترین باکتریوسین مورد استفاده است (۱۰). نیسین فعالیت ضد میکروبی را در برابر اکثر باکتری‌های گرم مثبت، به ویژه تولید کننده اسپور نشان می‌دهد (۱۱). خواص ضد میکروبی نیسین به توانایی آن در ایجاد منفذ در غشای سیتوپلاسمی و مهار سنتز پپتیدوگلیکان نسبت داده می‌شود که برای یکپارچگی دیواره سلولی باکتری بسیار مهم است. این اختلال در پتانسیل غشا و گرادیان pH منجر به مرگ سلولی می‌شود (۱۳و۱۲).

افزایش مقاومت در بین پاتوژن‌ها به آنتی بیوتیک‌های معمولی و عوارض جانبی نامطلوب درمان‌های فعلی منجر به علاقه روزافزون به کشف گیاهان دارویی سنتی و پروبیوتیک‌ها به عنوان منابع بالقوه برای کشف داروهای ضد میکروبی شده است. این مطالعه با هدف تعیین فعالیت ضد بیوفیلمی و ضد باکتریایی گانودرما لوسیدوم و نیسین در مقایسه با دهانشویه کلرهگزیدین بر روی استرپتوکوکوس موتانس در شرایط آزمایشگاهی انجام شد.

مواد و روش ها

مطالعه حاضر از نوع آزمایشگاهی و تجربی می‌باشد که توسط معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی همدان با کد مصوبه اخلاق IR.UMSHA.REC.1401.643 به تصویب رسید. در این مطالعه از سویه استاندارد استرپتوکوکوس موتانس PTCC 1683 تهیه شده از مرکز منابع زیستی ایران (تهران، ایران) استفاده شد. سویه باکتری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در محیط BHI (Brain Heart Infusion Broth) براث (ایبرسکو، ایران) کشت داده شد. برای تهیه عصاره گانودرما لوسیدوم ابتدا این قارچ از شرکت ایران گانودرما خریداری و به روش خیساندن استخراج شد. ابتدا ۵۰ گرم قارچ توسط آسیاب برقی پودر شده و با ۷۵۰ میلی لیتر الکل ۹۹٪ به همراه ۲۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر در ارلن مخلوط شده و به مدت ۷۲ ساعت در شیکر قرار داده شد. سپس با استفاده از کاغذ صافی از قیف بوخنر استخراج و خلاء ایجاد شد. الکل آن توسط دستگاه چرخشی در خلاء تقطیر، تغلیظ و استخراج شد و برای استفاده آماده شد (۱۴). در این مطالعه از نیسین N5764 (سیگما–آلدریچ، آمریکا) استفاده شد. محلول استوک نیسین با حل کردن ۵۰ میلی‌گرم نیسین در ۵ میلی‌لیتر هیدروکلریک اسید ۰/۰۲ نرمال و استریل کردن با فیلتراسیون (فیلتر اندازه منافذ ۰/۲۲ میکرومتر) تهیه شد.

برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (Minimum Inhibitory Concentration) و حداقل غلظت کشندگی (Bactericidal Minimum Concentration) عصاره گانودرما لوسیدوم، نیسین و دهانشویه کلرهگزیدین از روش براث میکرودایلوشن استفاده گردید (۱۵). به طور خلاصه، ۱۰ میکرولیتر از کشت استرپتوکوکوس موتانس (حدود 10^9 cfu/ml)، ۱۴۰ میکرولیتر محیط BHI (Brain Heart Infusion Broth) براث و ۵۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف مواد ضد میکروبی در میکروپلیت‌های ۹۶ چاهکی ترکیب شدند. غلظت حاصل از سه ماده ضد میکروبی به شرح زیر بود: غلظت نیسین ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱۲۵ و ۱/۵۶۲ میکروگرم در میلی‌لیتر است. غلظت عصاره گانودرما لوسیدوم ۱۰، ۵، ۲/۵، ۱/۲۵، ۰/۶۲۵، ۰/۱۳۲، ۰/۱۵۶، ۰/۰۷۸، ۰/۰۳۹، ۰/۰۱۹ و ۰/۰۰۹ میلی‌گرم در میلی‌لیتر است. غلظت کلرهگزیدین ۰/۲٪، ۰/۱٪، ۰/۰۵٪، ۰/۰۲۵٪، ۰/۰۰۶۲۵٪ و ۰/۰۰۳۱۲۵٪ است. جذب نوری (Optical Density) هر چاهک با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۷۰ نانومتر، قبل و بعد از قرار دادن میکروپلیت‌ها در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت اندازه گیری شد. MIC کمترین غلظت یک عامل ضد میکروبی است که در آن رشد باکتری متوقف می‌شود. MIC با اندازه گیری تغییر در OD هر چاهک پس از یک دوره انکوباسیون ۲۴ ساعته محاسبه شد. MBC با تلقیح ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری از چاهک

[DOI: 10.22088/jbums.27.1.37]

MIC و دو چاهک بالاتر روی محیط مولر هینتون آگار تعیین شد. پس از ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، کلنی‌های باکتری شمارش شدند. MBC کمترین غلظت از آنتی بیوتیک می‌باشد که قادر به از بین بردن ۹۹/۹٪ باکتری‌ها می‌باشد.

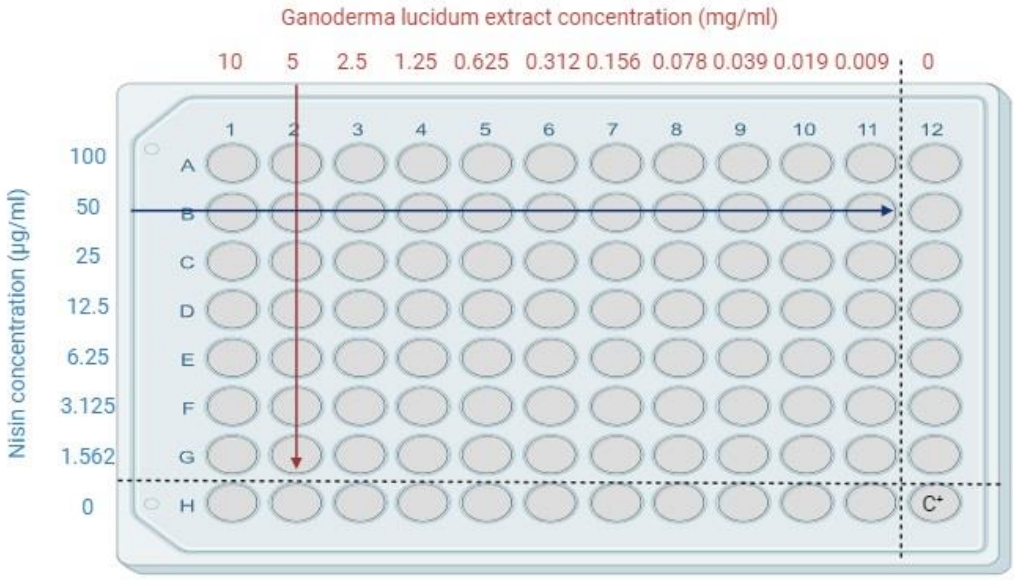
اثر ضد باکتریایی ترکیب عصاره گانودرما لوسیدوم و نیسین با روش چکربورد بررسی شد (۱۶). همانطور که در شکل ۱ مشاهده می‌کنید، ستون‌های ۱ تا ۱۱ حاوی رقت‌های سریالی ۲ برابری عصاره گانودرما لوسیدوم و ردیف های A تا G حاوی رقت‌های سریالی ۲ برابری از نیسین هستند. ستون ۱۲ شامل یک رقت سریالی از نیسین به تنهایی است، در حالی که ردیف H حاوی یک رقت سریالی از عصاره گانودرما لوسیدوم به تنهایی است. برای تعیین اثر متقابل عصاره گانودرما لوسیدوم و نیسین از شاخصی به نام غلظت مهاری کسری (Fractional Inhibitory Concentration Index) استفاده شد که از فرمول زیر محاسبه می‌شود.

FICA= MICA+B/MICA

FICB= MICB+A/MICB

FIC Index= FICA+FICB

در این روش اگر ۰/۵ ≥FICI باشد، نشان دهنده اثر هم افزایی، ۳/۹-۰/۴ =FICI نشان دهنده اثر تجمعی یا بی تفاوتی و ۴ ≤FICI نشان دهنده اثر تضاد می‌باشد.



شکل ۱. فعالیت ضد میکروبی ترکیبی عصاره گانودرما لوسیدوم و نیسین به روش چکربورد

اثر عصاره گانودرما لوسیدوم، نیسین و کلرهگزیدین بر استرپتوکوکوس موتانس با استفاده از روش میکروتیتر پلیت ارزیابی شد (۱۷). سویه استرپتوکوکوس موتانس به همراه غلظت‌های ۱/۲ MIC، ۱/۴ MIC و ۱/۸ MIC عصاره گانودرما لوسیدوم، نیسین و کلرهگزیدین در محیط BHI براث حاوی ۰/۲٪ ساکارز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. چاهک حاوی استرپتوکوکوس موتانس بدون حضور مواد ضد میکروبی به عنوان کنترل مثبت و چاهک حاوی محیط کشت بدون حضور ماده ضد میکروبی و باکتری به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. پس از انکوباسیون، محلول رویی از هر چاهک خارج شد و سه بار با محلول PBS شست و شو شد. برای تثبیت، ۲۰۰ میکرولیتر متانول ۹۹٪ به مدت ۱۵ دقیقه به هر چاهک اضافه شد. چاهک‌ها با ۲۰۰ میکرولیتر کریستال ویوله ۰/۱٪ به مدت ۵ دقیقه رنگ آمیزی شدند و رنگ‌های اضافی با آب مقطر استریل حذف شدند. رنگ‌های متصل شونده به بیوفیلم با استفاده از ۲۰۰ میکرولیتر اسید استیک ۳۳٪ به مدت ۱۵ دقیقه حل شدند. در مرحله آخر OD هر چاهک با استفاده از الایزا ریدر در طول موج ۵۷۰ نانومتر تعیین و ثبت شد. تمام آزمایشات دو بار تکرار شد.

[DOI: 10.22088/jbums.27.1.37]

روش چکربورد، برای ارزیابی فعالیت ضد بیوفیلمی عصاره گانودرما لوسیدوم در ترکیب با نیسین استفاده شد (۱۸). ابتدا ایزوله مورد مطالعه در محیط BHI حاوی ۰/۲٪ ساکارز تلقیح شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. سپس یک سوسپانسیون با کدورت استاندارد ۰/۵ مک فارلند از باکتری رشد یافته تهیه شد. برای رسیدن به تعداد 10^6 CFU/ml باکتری در حجم نهایی ۲۰۰ میکرولیتر رقت۱:۱۰۰ از آن ها تهیه شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون فوق به چاهک های میکروپلیت ۹۶ چاهکی حاوی ۵۰ میکرولیتر غلظت های مختلف MIC عصاره گانودرما لوسیدوم و نیسین اضافه شد. سپس پلیت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. پس از انکوباسیون، بیوفیلم طبق روش ذکر شده در اندازه گیری تأثیر مواد به تنهایی بر مهار بیوفیلم، با کریستال ویوله رنگ آمیزی شد. همچنین در مرحله آخر OD هر چاهک با استفاده از الایزاریدر در طول موج ۵۷۰ نانومتر تعیین و ثبت شد. نتایج آزمایش به صورت درصد مهار بیوفیلم پس از تیمار با مواد ضدمیکروبی طبق فرمول زیر به دست آمد (۱۸).

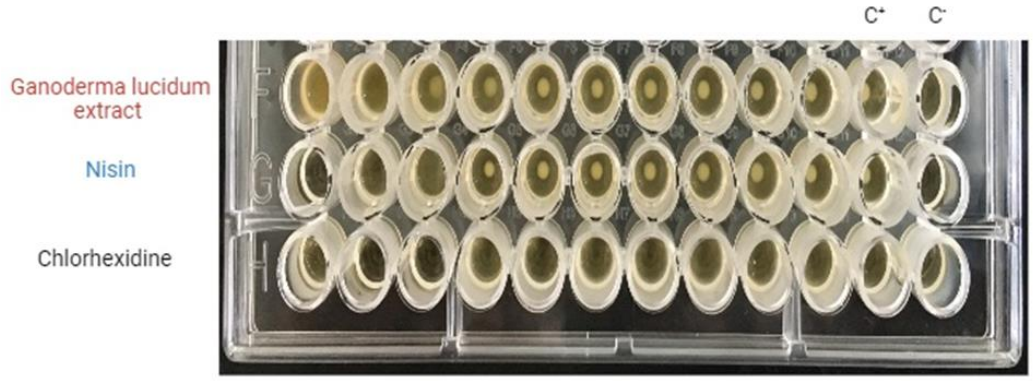
$$[(C-B) - (T-B)]/[(C-B)] \times 100$$

C: میانگین OD کنترل، B: میانگین OD چاهک کنترل منفی،T: میانگین OD چاهک تیمار.

داده ها در نرم افزار SPSS نسخه ۲۷ (IBM Corp., Armonk, NY, USA) وارد و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برای تست آماری از روش آنالیز واریانس یک طرفه استفاده شد و $p<۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

MIC عصاره گانودرما لوسیدوم، نیسین و دهانشویه کلرهگزیدین با استفاده از روش براث میکرودایلوشن تعیین گردید (شکل ۲). MIC عصاره گانودرما لوسیدوم و نیسین روی سویه استاندارد استرپتوکوکوس موتانس به ترتیب ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و MBC عصاره گانودرما لوسیدوم و نیسین روی سویه استاندارد به ترتیب ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شد. همچنین این باکتری نسبت به همه رقت‌های دهانشویه کلرهگزیدین حساس بود. بنابراین دهانشویه کلرهگزیدین خاصیت ضد میکروبی قوی‌تری نسبت به عصاره گانودرما لوسیدوم و نیسین در برابر باکتری استرپتوکوکوس موتانس دارد.



شکل ۲. ارزیابی حساسیت باکتری نسبت به عصاره گانودرما لوسیدوم، نیسین و دهانشویه کلرهگزیدین با استفاده از روش براث میکرودایلوشن

همچنین برای تعیین اثر متقابل عصاره گانودرما لوسیدوم و نیسین از FICI استفاده شد که این شاخص اثر بی تفاوتی این دو ماده در قدرت بازدارندگی از رشد باکتری مورد مطالعه را نشان داد (FICI=۲).

میزان تشکیل بیوفیلم در استرپتوکوکوس موتانس پس از تیمار با غلظت‌های مختلف عصاره گانودرما لوسیدوم، نیسین و دهانشویه کلرهگزیدین به تنهایی در مقایسه با چاهک کنترل مثبت کاهش یافت. همچنین، میزان کاهش تولید بیوفیلم در سویه مورد مطالعه وابسته به غلظت عامل ضدمیکروبی بود؛ به طوری که در غلظت‌های بیشتر، به طور معنی‌داری بیوفیلم کمتری تشکیل گردید ($p<۰/۰۵$) (جدول ۱).

[DOI: 10.22088/jbums.27.1.37]

جهت تعیین اثر ترکیب عصاره گانودرما لوسیدوم و نیسین بر تشکیل بیوفیلم در در استرپتوکوکوس موتانس، از روش چکربورد استفاده شد. نتایج بعد از تیمار سویه استاندارد استرپتوکوکوس موتانس با غلظت‌های مختلف عصاره گانودرما لوسیدوم و نیسین به صورت میزان تشکیل بیوفیلم قابل مشاهده است (جدول ۱). نتایج نشان داد طی تیمار با ترکیب دو ماده ضد میکروبی مهار تشکیل بیوفیلم بیشتر از زمانی بود که از هر یک از مواد ضدمیکروبی به تنهایی استفاده شد.

جدول ۱. تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره گانودرما لوسیدوم، نیسین و دهانشویه کلرهگزیدین به تنهایی و در ترکیب با هم بر مهار تشکیل بیوفیلم سویه استاندارد استرپتوکوکوس موتانس

نوع عامل ضد میکروبی	سویه استاندارد استرپتوکوکوس موتانس					p-value
عصاره گانودرما لوسیدوم	غلظت‌های به کار رفته از عصاره گانودرما لوسیدوم بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۲/۵	۱/۲۵	۰/۶۲۵	۰/۳۱۲	۰/۰۲۱
	میانگین جذب OD در ۵۷۰ نانومتر	۰/۳۲۳	۰/۳۵	۰/۳۶۵	۰/۳۸۶	
	میانگین درصد مهار بیوفیلم	۶۵	۶۱	۵۹	۵۶	
نیسین	غلظت های به کار رفته از نیسین بر حسب میکرو گرم بر میلی لیتر	۲۵	۱۲/۵	۶/۲۵	۳/۱۲۵	۰/۰۴۴
	میانگین جذب OD در ۵۷۰ نانومتر	۰/۲۳۷	۰/۳۱۵	۰/۳۵۸	۰/۴۳۵	
	میانگین درصد مهار بیوفیلم	۷۷	۶۶	۶۰	۴۹	
عصاره گانودرما لوسیدوم+نیسین	غلظت‌های به کار رفته از عصاره گانودرما لوسیدوم بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر + غلظت‌های به کار رفته از نیسین بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر	۲/۵+۲۵	۱/۲۵+۱۲/۵	۰/۶۲۵+۶/۲۵	۰/۳۱۲+۳/۱۲۵	۰/۰۱۲
	میانگین جذب OD در ۵۷۰ نانومتر	۰/۱۵۲	۰/۲۷۳	۰/۳۰۸	۰/۳۵۸	
	میانگین درصد مهار بیوفیلم	۸۹	۷۲	۶۷	۶۰	
دهانشویه کلرهگزیدین	رقت‌های به کار رفته از دهانشویه کلرهگزیدین بر حسب درصد	۰/۲	۰/۱	۰/۰۵	۰/۰۲۵	۰/۰۳۱
	میانگین جذب OD در ۵۷۰ نانومتر	۰/۱۳۹	۰/۱۸۸	۰/۲۳۷	۰/۲۸۷	
	میانگین درصد مهار بیوفیلم	۹۱	۸۴	۷۷	۷۰	

بحث و نتیجه گیری

بر اساس نتایج این مطالعه عصاره گانودرما لوسیدوم و نیسین دارای اثر مهارکنندگی، کشندگی و ضد بیوفیلمی بر استرپتوکوکوس موتانس می‌باشند اما نسبت به دهانشویه کلرهگزیدین اثر کمتری داشتند. علاوه بر این تیمار این باکتری با ترکیب دو ماده عصاره گانودرما لوسیدوم و نیسین باعث افزایش مهار بیوفیلم نسبت به زمانی بود که از هر یک از مواد ضدمیکروبی به تنهایی استفاده شد.

در مطالعه حاضر، MIC و MBC عصاره گانودرما لوسیدوم ۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود. از طرفی پژوهش Erbiai و همکاران نشان داد MIC عصاره گانودرما لوسیدوم بر علیه باکتری‌های اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب ۸ و ۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر است. این پژوهش همچنین نشان داد که MBC این عصاره بر علیه باکتری‌های اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب ۸ و ۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر است (۱۹). بنابراین عصاره تهیه شده در این مطالعه در رقت پایین تری خاصیت مهارکنندگی از رشد و کشندگی نسبت به باکتری استرپتوکوکوس موتانس نشان داد. البته روش تهیه عصاره و مقاومت باکتری‌ها مختلف ممکن است در این نتایج موثر باشد.

[DOI: 10.22088/jbums.27.1.37]

در مطالعه حاضر، MIC و MBC نیسین به ترتیب ۲۵ و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. Shin و همکاران نشان دادند MIC و MBC نیسین بر علیه استرپتوکوکوس موتانس UA159 به ترتیب ۲۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر است (۲۰). Jiamboonsri و همکاران نشان دادند MIC و MBC نیسین بر علیه باکتری استرپتوکوکوس موتانس ATCC 25175 بیشتر از ۴۰۰۰ واحد بین المللی در میلی لیتر (IU/ml) است (۲۱). تفاوت در MIC و MBC مطالعه ما با سایر مطالعات ممکن است به دلیل نوع نیسین مورد استفاده و سویه استاندارد مورد مطالعه باشد.

پژوهش Mozaffari و همکاران نشان داد، دهانشویه کلرهگزیدین در رقت های ۰/۲، ۰/۱، ۰/۰۱ و ۰/۰۲ درصد از رشد باکتری‌های استرپتوکوکوس سانگوئینیس، استرپتوکوکوس موتانس و لاکتوباسیلوس کازئی در محیط کشت ممانعت می‌کند (۲۲). این نتایج با یافته‌های حاصل از پژوهش حاضر همخوانی دارد و بیانگر خاصیت ضد میکروبی نسبتاً قوی کلرهگزیدین بر استرپتوکوکوس موتانس می‌باشد.

مطالعه Karaca و همکاران نشان داد، قدرت تشکیل بیوفیلم سویه‌های انتروکوکوس در اثر تیمار با غلظت‌های مختلف عصاره گانودرما لوسیدوم کاهش یافته است. به طوری که هرچه باکتری با غلظت بالاتری از عصاره تیمار شد درصد کاهش تولید بیوفیلم بیشتر شد (۲۳). مطالعه Tong و همکاران نیز کاهش توانایی تشکیل بیوفیلم باکتری استرپتوکوکوس موتانس را پس از تیمار با نیسین نشان داد (۲۴). از طرفی نتایج مطالعه حاضر با این مطالعات همخوانی دارد و بیانگر افزایش درصد مهار تشکیل بیوفیلم باکتری مورد مطالعه در اثر تیمار با غلظت‌های مختلف عصاره گانودرما لوسیدوم و نیسین بود. همچنین ترکیب این دو ماده باعث کاهش توانایی تشکیل بیوفیلم توسط استرپتوکوکوس موتانس شد.

نتایج این مطالعه می‌تواند پیشنهاد کننده این مساله باشد که برای افزایش فعالیت ضد بیوفیلمی نیسین از عصاره گانودرما لوسیدوم به صورت ترکیبی با نیسین می‌توان استفاده کرد. با این وجود جهت کاربرد عملی این ترکیب، پیشنهاد می‌گردد اثر آن‌ها با سایر مواد ضد میکروبی و بر روی دیگر پاتوژن‌ها سنجیده شود.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی همدان به جهت تصویب این طرح، همچنین از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی بابل جهت حمایتشان در انجام این تحقیق قدردانی می‌گردد.

[DOI: 10.22088/jbums.27.1.37]

References

1.Al-Ibraheem J, Zyara Y, Al-Quraine N, Abdulridha WM. Correlation between salivary immunoglobulin A and interleukin-1beta in smokers with dental caries. F1000Res. 2023;12:175.

2.Cai JN, Kim D. Biofilm ecology associated with dental caries: understanding of microbial interactions in oral communities leads to development of therapeutic strategies targeting cariogenic biofilms. Adv Appl Microbiol. 2023;122:27-75.

3.Ribeiro SM, Fratucelli ÉDO, Bueno PCP, de Castro MKV, Francisco AA, Cavalheiro AJ, et al. Antimicrobial and antibiofilm activities of Casearia sylvestris extracts from distinct Brazilian biomes against Streptococcus mutans and Candida albicans. BMC Complement Altern Med. 2019;19(1):308.

4.Yan L, Wu W, Tian S. Antibacterial and antibiofilm activities of Trollius altaicus C. A. Mey. On Streptococcus mutans. Microb Pathog. 2020;149:104265.

5.Du Y, Tian L, Wang Y, Li Z, Xu Z. Chemodiversity, pharmacological activity, and biosynthesis of specialized metabolites from medicinal model fungi Ganoderma lucidum. Chin Med. 2024;19(1):51.

6.Mowna Sundari T, Alwin Prem Anand A, Jenifer P, Shenbagarathai R. Bioprospection of Basidiomycetes and molecular phylogenetic analysis using internal transcribed spacer (ITS) and 5.8S rRNA gene sequence. Sci Rep. 2018;8(1):10720.

7.Gholami A, Karami E, Ebrahimpoorghalehjoghi S, Hajjarzadeh M, Javadi K, Bakhtiari M, et al. The therapeutic effects of Ganoderma lucidum on cancer and immune system such as Anti-Tumor, Anti-Metastatic, Antioxidant, Anti-Angiogenic, Anti-Inflammatory and Immuno-Modulating. Plant Biotechnol Persa. 2023;5(2):68-85.

8.El-Khashab IH. Antiangiogenic and Proapoptotic Activities of Atorvastatin and Ganoderma lucidum in Tumor Mouse Model via VEGF and Caspase-3 Pathways. Asian Pac J Cancer Prev. 2021;22(4):1095-104.

9.Tavares TD, Ribeiro ARM, Silva C, Antunes JC, Felgueiras HP. Combinatory effect of nisin antimicrobial peptide with bioactive molecules: A review. J Drug Deliv Sci Technol. 2024;91:105246.

10.Roshanak S, Shahidi F, Tabatabaei Yazdi F, Javadmanesh A, Movaffagh J. Evaluation of Antimicrobial Activity of Buforin I and Nisin and Synergistic Effect of the Combination of them as a Novel Antimicrobial Preservative. J Food Prot. 2020;83(11):2018-25.

11.Yu X, Lu N, Wang J, Chen Z, Chen C, Regenstein JM, et al. Effect of N-terminal modification on the antimicrobial activity of nisin. Food Control. 2020;114:107227.

12.Zhou H, Fang J, Tian Y, Lu XY. Mechanisms of nisin resistance in Gram-positive bacteria. Ann Microbiol. 2014;64:413-20.

13.Sun Z, Li P, Liu F, Bian H, Wang D, Wang X, et al. Synergistic antibacterial mechanism of the Lactobacillus crispatus surface layer protein and nisin on Staphylococcus saprophyticus. Sci Rep. 2017;7(1):265.

14.Akbari S, Chabavizadeh J, Abtahi SM, Yegdaneh A, Namdar F, Saberi S. Evaluation of Antileishmanial Effect of Hydroalcoholic Extract of Ganoderma Leucidum on Leishmania Major in Vitro. J Isfahan Med Sch. 2019;36(511):1628-34. [In Persian]

15.Tong Z, Zhou L, Jiang W, Kuang R, Li J, Tao R, et al. An in vitro synergetic evaluation of the use of nisin and sodium fluoride or chlorhexidine against Streptococcus mutans. Peptides. 2011;32(10):2021-6.

16.Tong Z, Zhang Y, Ling J, Ma J, Huang L, Zhang L. An in vitro study on the effects of nisin on the antibacterial activities of 18 antibiotics against Enterococcus faecalis. PLoS One. 2014;9(2):e89209.

[DOI: 10.22088/jbums.27.1.37]

17.Mataraci E, Dosler S. In vitro activities of antibiotics and antimicrobial cationic peptides alone and in combination against methicillin-resistant Staphylococcus aureus biofilms. Antimicrob Agents Chemother. 2012;56(12):6366-71.
18.Rosato A, Sblano S, Salvagno L, Carocci A, Clodoveo ML, Corbo F, et al. Anti-Biofilm Inhibitory Synergistic Effects of Combinations of Essential Oils and Antibiotics. Antibiotics (Basel). 2020;9(10):637.
19.Erbiai EH, Amina B, Kaoutar A, Saidi R, Lamrani Z, Pinto E, et al. Chemical Characterization and Evaluation of Antimicrobial Properties of the Wild Medicinal Mushroom Ganoderma lucidum Growing in Northern Moroccan Forests. Life (Basel). 2023;13(5):1217.
20.Shin JM, Ateia I, Paulus JR, Liu H, Fenno JC, Rickard AH, et al. Antimicrobial nisin acts against saliva derived multi-species biofilms without cytotoxicity to human oral cells. Front Microbiol. 2015;6:617.
21.Jiamboonsri P, Kanchanadumkerng P. Influence of Gallic Acid and Thai Culinary Essential Oils on Antibacterial Activity of Nisin against Streptococcus mutans. Adv Pharmacol Pharm Sci. 2021;2021:5539459.
22.Mozaffari B, Mansouri S, Rajabalian S, Alimardani A, Mohammadi M. In vitro study between antibacterial and cytotoxic effects of chlorhexidine and persica mouthrinses. J Dent Sch-Shahid Beheshti Univ Med Sci. 2005;23(3):494-509. [In Persian]
23.Karaca B, Cihan AÇ, Akata I, Altuner EM. Anti-Biofilm and Antimicrobial Activities of Five Edible and Medicinal Macrofungi Samples on Some Biofilm Producing Multi Drug Resistant Enterococcus Strains. Turk J Agr -Food Sci Technol. 2020;8(1):69-80.
24.Tong Z, Zhang L, Ling J, Jian Y, Huang L, Deng D. An in vitro study on the effect of free amino acids alone or in combination with nisin on biofilms as well as on planktonic bacteria of Streptococcus mutans. PLoS One. 2014;9(6):e99513.

[DOI: 10.22088/jbums.27.1.37]