مقاله پژوهشی

بررسی اثر بازدارندگی عصاره ریز جلبک کلرلا ولگاریس بر رشد، تکثیر و تشکیل بیوفیلم توسط استرپتوکوکوس موتانس و ارزیابی سمیت آن

شیما جعفری[۱و۲و۳]، محمدعلی مباشر[۱و۲و۴و۵*]، سهراب نجفی‌پور[۱و۶]، یونس قاسمی[۴و۵]، نازنین مباشر[۷]، محمدمهدی نقی‌زاده[۱]، محمدعلی ابراهیمی[۳]

۱- مرکز تحقیقات بیماری‌های غیر واگیر، دانشگاه علوم پزشکی فسا، فسا، ایران.
۲- گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی فسا، فسا، ایران.
۳- گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.
۴- گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.
۵- مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.
۶- گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی فسا، فسا، ایران
۷- گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۰۲/۲۸ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۰۵/۱۶

چکیده

زمینه و هدف: پوسیدگی دندان یک بیماری مهم و حائز بحث می‌باشد که علت اصلی آن وجود باکتری استرپتوکوکوس موتانس از خانواده ویریدانس است. در این پژوهش در زمینه خاصیت ضد میکروبی ریزجلبک کلرلا ولگاریس در ممانعت از رشد، تکثیر استرپتوکوکوس موتانس و همچنین تشکیل بیوفیلم توسط این باکتری مطالعه‌ای صورت گرفته است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه ریزجلبک کلرلا ولگاریس به روش خیساندن در حلال استن، متانول و کلروفورم به نسبت (۲/۱/۱) عصاره‌گیری شده و اثرات ضدمیکروبی به روش‌های انتشار دیسک، چاهک، MIC وMBC بررسی شد. ارزیابی فعالیت ضدبیوفیلم در پلیت‌های پلی‌استیرنی و ارزیابی تست سمیت سنجی آرتمیای دریاچه ارومیه با استفاده از ذره‌بین شیشه‌ای و استریومیکروسکوپ شمارش گردید.

نتایج: نتایج حاصل از انتشار دیسک و چاهک از عصاره کلرلا ولگاریس به ترتیب با میانگین هاله عدم رشد ۱۶/۵ و ۲۳ میلی‌متر در محیط مولر هینتون اگار و حداقل غلظت مهارکننده و حداقل غلظت باکتری‌کشی عصاره به ترتیب در غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نشان داده شد. همچنین در جلوگیری از تشکیل بیوفیلم در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و بالاتر موثر بود و در ارزیابی سمیت سنجی عصاره در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از خود نشان داد.

نتیجه‌گیری: طی بررسی‌های صورت گرفته عصاره کلرلا ولگاریس در مقایسه با آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین به طور معنی‌داری خاصیت ضد میکروبی داشته و قادر به از بین بردن بیوفیلم استرپتوکوکوس موتانس می‌باشد ($P<0/05$). همچنین در غلظت‌های مورد بررسی اثر سمیت عصاره‌ی کلرلا ولگاریس بر آرتمیای میگوی آب شور یافت نشد.

کلمات کلیدی: استرپتوکوکوس موتانس، کلرلا ولگاریس، پوسیدگی دندان، آرتمیا ارومیانا، بیوفیلم

مقدمه

علم شناسایی و استفاده از گیاهان دارویی به قدمت عمر انسان بر می‌گردد. تا قبل از قرن ۱۹ میلادی استفاده از منابع طبیعی و عمدتاً گیاهان از راه‌های اصلی درمان بیماری‌ها بوده است. اما پیشرفت سریع علم شیمی و کمبود منابع طبیعی باعث شد که ترکیبات شیمیایی جدید جایگزین داروهای گیاهی شود و امروزه دانشمندان بسیاری از رشته‌های دیگر به داروهای گیاهی روی آورده‌اند (۱). بیش از دو هزار سال است که از جلبک‌ها در صنایع دارویی و غذایی استفاده می‌شود. کاربرد آن‌ها

* **نویسنده مسئول:** **محمد علی مباشر**، مرکز تحقیقات بیماری‌های غیر واگیر، دانشگاه علوم پزشکی فسا، فسا، ایران.
Email: mobasherm@sums.ac.ir

در پزشکی سنتی انگیزه‌هایی را ایجاد کرده که محققان مطالعات گسترده‌ای را در مورد خواص آن ها آغاز کنند. ریزجلبک ها گروهی از میکروارگانیسم‌های ساده‌ی یک یا چند سلولی هستند که دارای توانایی بالقوه‌ای در تثبیت کربن دی‌اکسید نسبت به سایر گیاهان خاکزی، هستند که از این میان ریزجلبک‌های اسپیرولینا و کلرلا ولگاریس دارای اهمیت بسزایی در تولید سوخت‌های زیستی هستند (۲).

کلرلا کروی شکل بوده و دارای دیواره‌ی نسبتاً نازک و کلروپلاست بزرگ فنجانی شکل می‌باشد، که درون آن هسته تقریباً در شتی در بالای کلروپلا ست قرار گرفته ا ست. تولید مثل در کلرلا بسیار ساده و از طریق تولید مثل غیرجنسی ا ست (۳). کلرلا ولگاریس ریزجلبکی مشهور است که جهت مصارف آرایشی و بهداشتی و دارویی ا ستفاده شده ا ست. این جلبک با قطر ۱۰-۲ میکرون ساکن آب‌های شیرین ا ست، کلرلا م شابه گیاهان از فعال‌ترین موجودات فتوسنتز کننده بوده و دارای کلروفیل با تراکم بالاست، بخشی از خواص درمانی کلرلا در بدن مربوط به مقدار زیاد کلروفیل و ساختمان دیواره سلولی و علی‌الخصوص مواد متشکله در این دیواره سلولی ا ست. این جلبک سلامتی و قدرت دفاعی پوست بدن را بهبود می‌بخشد (۳، ۴ و ۳۰).

در این راستا مواد مختلفی مثل اسید آمینه، ترپنوئید، فلورانتین، آلکان ها، کتون های هالوژنه، ترکیبات استروئیدی، سولفیدهای حلقوی، اسیدهای چرب، فنل‌ها از جلبک‌ها به دست آمده ا ست (۵). برخی از آن‌ها تاثیر ضدباکتریایی دارند. به‌عنوان مثال می‌توان از آنتی‌بیوتیک chlorellin نام برد که از جلبک کلرلا استخراج می‌شود (۱، ۶).

جلبک‌های دریایی با ایجاد جایگاه و شرایط مناسب و ایده‌آل برای جانوران دریایی از جمله بچه ماهیان و آبزیان و سخت‌پوستان دریایی مانند میگوی آب شور دریاچه‌ها حائز اهمیت هستند. علاوه بر آن ریزجلبک ها و ماکروجلبک ها در صنایع آرایشی، بهداشتی، دارویی و صنایع تولید سوخت‌های زیستی مورد بهره‌برداری قرار می‌گیرند. در واقع آلودگی های زیست محیطی ناشی از ا ستفاده سوخت‌های فسیلی و به دنبال آن ضرر و زیان‌های وابسته به ا ستفاده از این دسته از سوخت‌ها همه محققان را به ارایه راه‌کارهایی برای ایجاد روش‌های بهتر و رو به بهبود در طبیعت و محیط زیست وا داشته است (۷).

یکی از بیماری‌هایی که در همه‌ی اقشار جامعه و در تمامی سنین دیده می‌شود، بیماری پوسیدگی دندان است؛ که عامل آن می‌توانند عوامل مختلفی از جمله رعایت نکردن بهداشت دهان و دندان و به‌دنبال آن تجمع باکتری‌هایی که مسبب تخریب و پوسیدگی دندان‌ها می‌گردند، باشد (۸). یافته‌های علمی جدید در ارتباط با عوامل پوسیدگی دندان نشان دادند که ترکیباتی مانند کموپروفیتولاکتیک ها، کازئین، فلورا ید، واکسن ها، شیرین‌کننده‌های جایگرین ساکاروز به عنوان مواد ضدپلاک و پوسیدگی دندان موثر می‌باشند (۸، ۹).

قابلیت تشکیل بیوفیلم از مشخصه اصلی استرپتوکوکوس‌های موتانس به عنوان عامل اصلی عفونت‌های دهان و دندان نسبت به استرپتوکوکوس‌های ویریدانس است. این باکتری از نظر ظاهری، کوکسی گرم مثبت و کاتالاز منفی و بی‌هوازی اختیاری است و جز فلور نرمال دهان محسوب می‌شود. استرپتوکوک موتانس با تخمیر سوکروز و تولید اسیدلاکتیک موجب تخریب مینای دندان می‌شوند. همچنین این باکتری از سوکروز برای ساخت پلاک دندانی استفاده می‌کند. پلاک دندانی از دکستران که نوعی پلی‌ساکارید است، ساخته می‌شود. رعایت بهداشت دهان و استفاده از مسواک، از رشد باکتری، تشکیل پلاک و پوسیدگی دندان‌ها جلوگیری می‌کند (۱۰، ۱۱).

بعد از سال‌ها استفاده از مواد شیمیایی مانند کلرهگزیدین و تری کلوزان، اخیراً جایگزین‌سازی آن‌ها با مواد و عصاره‌های طبیعی و موثر گیاهی در اولویت قرار گرفته است (۱۳). به طور مثال، مارک معتبر خمیر دندان Parodontax® تولید شده در GlaxoSmithKline, Middlesex کشور انگلستان، علاوه بر بی‌کربنات سدیم و سدیم فلوراید، شامل مواد موثره گیاهی مانند عصاره بابونه، با خاصیت ضدالتهابی و کاهش‌دهنده التهاب لثه، عصاره گیاه اکیناسه با خاصیت تقویت پاسخ‌های ایمنی، عصاره مریم گلی و گیاه علف مبارک با خاصیت جلوگیری از خون‌ریزی، صمغ myrrh با خاصیت ضدعفونی کنندگی و روغن نعناع با خاصیت ضددردی، ضدباکتری و ضدالتهابی می‌باشد (۱۳). مطالعات مختلفی که بر روی این خمیر دندان صورت گرفته تاثیر علمی آن را در جلوگیری از پوسیدگی دندان و التهاب لثه گزارش داده‌اند (۱۳).

در مطالعه‌ای که در سال ۱۳۹۰ توسط آقایی و همکاران روی گیاه استویا از نظر میزان رشد باکتری استرپتوکوکوس موتانس صورت گرفت مشخص شد که عصاره استونی و الکلی گیاه استویا که در جنوب آمریکا، برزیل و پاراگوئه رشد دارد می‌تواند به عنوان یک ماده پیش‌گیری کننده از پوسیدگی دندان و مهارکننده رشد باکتری استفاده شود (۱۴). با توجه به اهمیت روز افزون ریزجلبک‌ها در تولید انواع محصولات دارویی، آرایشی، بهداشتی و حتی سوخت‌های سبز و بدون آلودگی و با در نظر گرفتن این که در مقالات هنوز مطالعه جامعی بر اثر عصاره ریزجلبک پر اهمیت کلرلا ولگاریس بر باکتری استرپتوکوکوس موتانس به عنوان اصلی‌ترین عامل ایجاد فساد دندانی صورت نگرفته است، در این مطالعه تلاش شده است تا با جداسازی و خالص‌سازی کلرلا ولگاریس از برکه‌ها و آب‌گیرهای اطراف استان فارس، به صورت بومی اثرات عصاره سلولی بر باکتری استرپتوکوکوس موتانس بررسی شود. همچنین اثرات سمی احتمالی این ریزجلبک بر آرتیما ارومیانا دریاچه ارومیه که به عنوان غذای آبزیان و یک منبع غنی از پروتئین مطرح می‌باشد و ساختارهای پمپ سدیم و پتاسیم و RNA و DNA پلیمراز مشابه پستانداران دارد، مورد ارزیابی قرار گرفته است (۱۲).

مواد و روش‌ها

جداسازی ریزجلبک کلرلا ولگاریس: در ابتدا ریزجلبک کلرلا ولگاریس از برکه‌ها و شالی‌زارهای اطراف شهرستان کامفیروز استان فارس به صورت بومی جمع‌آوری گردید و در زیر میکروسکوپ از لحاظ ریخت‌شناسی بررسی و شناسایی شد و توسط روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز 18S rRNA تعیین هویت گردید (۲۸، ۲۹).

نمونه‌های تعیین هویت شده در محیط جامد BG-11 به صورت کشت چمنی کشت داده شد و در شرایط ثابت از نظر دمایی (۲ ± ۲۵ درجه سانتی گراد) و نوردهی مناسب (37 $\mu mol\ m^{-2}s^{-1}$) قرار گرفت (۱۵). پس از تشکیل کلنی‌های منفرد بر سطح محیط جامد، یکی از آن تک‌کلنی‌ها را برداشته و به محیط مایع BG-11 در و یال هایی به حجم ۱۰۰۰ میکرولیتر انتقال داده و در شرایط نور و دمای مناسب (۲ ± ۲۵ درجه سانتی گراد) قرار گرفته شد (۱۵). بعد از گذ شت زمان ۱۵ روز جهت اطمینان از افزایش غلظت کلرلا ولگاریس، در این مدت شمارش سلولی در زیر میکروسکوپ با استفاده از لام هموسایتومتری صورت گرفته و حجم محیط مایع BG-11 را رفته رفته افزایش داده تا در نهایت به حجم ۵۰۰ میلی‌لیتر در ظروف ارلن‌مایر برسد، که از این مقدار هم برای کشت ریزجلبک در حجم های ۶-۵ لیتر در چندین ظرف به عنوان تلقیح و هم برای ذخیره ریزجلبک به عنوان بانک ریزجلبکی استفاده شد.

تهیه و کشت باکتری: آمپول لیوفیلیزه باکتری استرپتوکوکوس موتانس سویه PTCC1683 از بانک ملی ذخایر ژنتیکی ایران تهیه و در محیط Brain Heart Infusion Broth (BHI Broth) و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. پس از رسیدن به کدورت مناسب (نیم مک‌فارلند که معادل با 1.5×10^8 باکتری) (۱۶)، جهت ایجاد تک‌کلنی بر روی محیط BHI Agar کشت داده شد و تا زمان بررسی خاصیت ضدمیکروبی عصاره در فریز ۲۰- درجه سانتی گراد به صورت دیپ فریز، نگهداری شد.

عصاره‌گیری: توده سلولی ریزجلبک کلرلا بعد از قرارگیری در فاز لگاریتمی (۱۷)، به وسیله‌ی سانتریفیوژ در دور ۶۰۰۰ rpm و در مدت ۶ دقیقه جداسازی (MPW-350R-GERMANY) شد. سپس توسط دستگاه خشک‌کن انجمادی (GLD-136C-JAPAN) لیوفیلیز و نسبت ۵ گرم در ۲۰۰ میلی‌لیتر حلال استن، متانول، کلروفرم (v/v/v۲/۱/۱) به مدت ۴۸ ساعت خیسانده سپس سوسپانسیون حاصله به مدت ۵ دقیقه در دستگاه سونیکاتور تحت اثر با فرکانس 20-50 kHz (UR-20P-JAPAN) قرار گرفت و بعد از فیلترشدن از کاغذ صافی در دستگاه rotary evaporator (R206B 2L-SENCO China) در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد تغلیظ گردید.

ارزیابی اثرات ضدباکتریایی

آماده سازی محیط کشت باکتری : در ابتدا باکتری استرپتوکوکوس موتانس در محیط BHI Broth به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد، سپس به منظور ایجاد تک‌کلنی در محیط BHI agar به همراه ۵٪ خون

گوسفندی کشت صورت گرفته و مجدداً در دما و زمان تعریف شده، در انکوباتور قرار گرفت.

روش انتشار دیسک: جهت ارزیابی خاصیت ضدمیکروبی به وسیله انتشار دیسک ابتدا دیسک‌های خالی یا blank paper را در اتوکلاو گذاشته، سپس از کشت ۲۴ ساعت، باکتری مطابق با استاندارد نیم مک‌فارلند بر روی سطح پلیت به صورت چمنی کشت صورت گرفت. از استوک تهیه شده با استن در غلظت mg ۱۰۰ ml^{-1} میزان ۲۵ میکرولیتر را بر روی هر دیسک ریخته و در مجاورت هوا گذاشته تا خشک شود و بعد به محیط مولر هینتون آگار، انتقال داده شد. از آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین (۱۰ میکروگرم /۲۵ میکرولیتر) به عنوان کنترل مثبت و محلول استن، کلروفورم و متانول هم به عنوان کنترل منفی استفاده شد و در مجاورت ٪۵ CO_2 به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت. قطر هاله‌ها با کمک خط‌کش میلی‌متری اندازه‌گیری و با کمک رفرانس استاندارد CLSI 2007 مورد مطابقت و ارزیابی قرار گرفت (۱۸، ۱۹).

روش انتشار چاهک: در روش انتشار چاهک با کمک سوراخ‌کن حفره‌هایی با حجم ۵۰ میکرولیتر در محیط آگار ایجاد شد. در هر کدام از چاهک‌ها نمونه‌ی مورد بررسی به همراه کنترل منفی و کنترل مثبت طبق دستوری که در انتشار دیسک ذکر شد، اضافه گردید؛ و به مدت ۲۴ ساعت در مجاورت ٪۵ دی‌اکسیدکربن در انکوباتور قرار گرفت. نتایج هاله‌های عدم رشد باکتری با کمک خط‌کش میلی‌متری اندازه گیری گردید (۱۸ و ۱۹).

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی رشد عصاره کلرلا ولگاریس با روش Broth micro dilution: با کمک این روش حداقل غلظت بازدارندگی یا MIC سنجیده می‌شود. برای تعیین MIC نمونه مورد نظر از پلیت‌های ۹۶ خانه استفاده گردید (۲۰). نمونه‌ها شامل غلظت‌های mg/ml ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱ از عصاره به همراه آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین به عنوان کنترل مثبت، محیط کشت و باکتری به عنوان کنترل منفی، عصاره و محیط کشت به عنوان بلانک مد نظر قرار گرفته شد. هر آزمایش در سه تکرار اجرا گردید. سوسپانسیون باکتری مطابق با استاندارد نیم مک‌فارلند به همراه محیط Muller Hinton broth به میزان ۲۰۰ میکرولیتر به هر چاهک اضافه شد و توسط دستگاه الایزاریدر میزان جذب هر چاهک در طول موج ۴۹۲ نانومتر محاسبه گردید. از مقایسه میزان جذب نوری قبل و بعد از انکوباسیون همه چاهک‌ها کمترین میزان رقت به عنوان MIC در نظر گرفته شد.

تعیین حداقل غلظت باکتری کشی عصاره کلرلا ولگاریس با روش Broth micro dilution: به منظور به دست آوردن حداقل غلظت باکتری‌کشی یا minimum bactericidal concentration، ۵۰ میکرولیتر از پنج غلظت اول چاهک‌های MIC را در محیط کشتBHI agar به همراه ٪۵ blood sheep در محیط جامد به صورت خطی، کشت داده شد و در انکوباتور به مدت ۲۴ ساعت گذاشته و از نظر میزان رشد باکتری و تشکیل کلنی مورد بررسی قرار گرفت.

چاهکی که حاوی کم‌ترین غلظت عصاره بود و در پلیت مربوطه عدم رشد باکتری مشاهده گردیده به عنوان MBC شناخته شد. به منظور تایید نتایج آزمون ۶ بار تکرار شد.

تشکیل بیوفیلم: به منظور بررسی تشکیل بیوفیلم کلنی‌های باکتری استرپتوکوکوس موتانس از پلیت ۹۶ خانه پلی‌استیرن استفاده شد، ابتدا باکتری را طبق استاندارد نیم مک فارلند ($۱۰^{۸}$× ۱/۵) تهیه نموده، سپس از محیط BHI broth به همراه سوکروز ٪۲ و باکتری به چاهک‌ها تلقیح و سپس مواد مورد آزمون در غلظت‌های مختلف به هر چاهک اضافه نموده و در انکوباتور ۳۷ درجه به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شد. آمپی‌سیلین و باکتری به عنوان کنترل مثبت و منفی لحاظ گردیدند. بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون، محتوی همه‌ی چاهک‌ها به آرامی تخلیه و جهت تثبیت بیوفیلم باکتری، متانول خالص به میزان ۲۰۰ میکرولیتر به مدت ۱۰ دقیقه به چاهک‌ها اضافه شده و در دمای اتاق قرار گرفت. بعد از تخلیه، رنگ کریستال ویوله ۱ درصد w/v افزوده شده و به مدت ۲۰ دقیقه در مجاورت این رنگ و دمای اتاق قرار گرفت. بعد از تخلیه رنگ و شستشو با آب مقطر سه بار اسید الکل را به آن اضافه نموده و جذب همه‌ی چاهک‌ها با دستگاه الایزاریدر در طول موج ۵۵۰ نانومتر، قرائت شد (۲۱). هر آزمون، ۳ بار تکرار پذیرفت.

تست ارزیابی سمیت عصاره کلرلا ولگاریس بر میگوی آب شور دریاچه ارومیه: سیست‌های آرتمیا ارومیانا از شیلات مرکز آذربایجان غربی، شهرستان ارومیه تهیه گردید. سیست

آرتمیا را در ظروف مخروطی در شوری ۳۰٪، pH بین ۹-۷/۲، دمای ۲۹ -۲۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸-۲۴ ساعت گذاشته شد. بعد از خروج از تخم (هچ شدن)، تعداد ۱۰ عدد لارو آرتمیا (ناپلی آرتمیا) به پلیت‌های ۱۲ خانه‌ای کشت سلول با حجم نهایی ۲۰۰۰ میکرولیتر اضافه شد و در معرض غلظت‌های متفاوت عصاره کلرلا ولگاریس (۱۰۰، ۵۰، ۲۵ mg/ml) قرار گرفت. تعداد و میزان مرگ و میر ناپلی آرتمیا در فاصله‌های زمانی ۰، ۴، ۸، ۱۲ و ۲۴ ساعت بعد از قرار گرفتن در مجاورت عصاره‌ی کلرلا ولگاریس با ذره‌بین شمارش شده و مورد بررسی قرار گرفت (۲۲). کنترل منفی آزمایش، آب شور مصنوعی و کنترل مثبت، محلول tween 20 استفاده شد. در این مرحله نیز، هر آزمون سه بار تکرار شد و در هر بار تعداد لاروهای زنده با کمک ذره‌بین شمارش گردید.

بررسی آماری: نتایج کمی حاصل از روش‌های سنجش اثر عصاره در آزمون‌های مختلف به طور جداگانه در هر روش با استفاده از نرم‌افزار SPSS 16 و تست واریانس یک طرفه و t-test مورد مقایسه قرار گرفت و معنی‌دار بودن داده‌ها، مورد ارزیابی واقع شد. نتایج به صورت ± انحراف معیار بیان شد و p کمتر ۰/۰۵ معنی‌دار، در نظر گرفته شد.

نتایج

در تست ضدمیکروبی به روش دیسک مقادیر ۲/۵، ۱/۲۵، ۰/۶۲ میلی‌گرم از عصاره‌ی کلرلا ولگاریس در هر کدام از دیسک‌ها بارگذاری شد که تنها در دیسک با غلظت ۲/۵ میلی‌گرم هاله عدم رشد به میزان میانگین ۱۶/۵ میلی‌متر اندازه‌گیری شد. هاله‌ی عدم رشد در دیسک حاوی آمپی‌سیلین ۲۲/۱ میلی‌متر اندازه‌گیری شد. در روش چاهک هاله‌ی عدم رشد در مورد کلرلا ولگاریس با غلظت ۰/۱ mg/µl به طور میانگین ۲۳ میلی‌متر می باشد. این مقدار در مورد آمپی‌سیلین ۲۴/۳ گزارش شده است.

ارزیابی حداقل غلظت مهار کننده رشد (MIC): جهت به دست آوردن حداقل غلظت مهار کننده رشد، غلظت‌های ۱۰۰mg/ml، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱ از عصاره به ترتیب در هر کدام از چاهک‌ها به همراه ۱۰ میکرولیتر از باکتری بارگذاری شد، که حداقل کدورت رشد باکتری در غلظت ۲۵ mg/ml مشاهده شد.

ارزیابی حداقل غلظت کشندگی عصاره (MBC): در ارزیابی اثر حداقل غلظت کشندگی باکتری استرپتوکوکوس موتانس، از بین غلظت‌های ۱۰۰mg/ml، ۵۰، ۲۵ عصاره ریزجلبک کلرلا ولگاریس در غلظت ۵۰ mg/ml اثر باکتریسیدال داشته است.

بررسی اثر ممانعتی عصاره بر تشکیل بیوفیلم: در ارزیابی بیوفیلم باکتری، غلظت‌های mg/ml ۱۰۰، ۵۰، ۲۵ از عصاره‌ی ریزجلبک کلرلا ولگاریس به میکروچاهک‌ها اضافه گردید، آمپی‌سیلین به عنوان کنترل مثبت و باکتری به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. که در چاهک‌های با غلظت ۱۰۰ و ۵۰ میلی گرم در میلی لیتر خاصیت ضد بیوفیلم مشاهده شد.

تست سمیت میگوی آب شور: در تست ارزیابی سمیت توسط آرتمیا ارومیانا، غلظت‌های mg/ml ۱۰۰، ۵۰، ۲۵ از ریز جلبک کلرلا ولگاریس به پلیت‌های کشت سلول اضافه گردید. در زیر نمودار فعالیت سمیت سلولی و تعداد لاروهای زنده گزارش شده است (شکل ۱).

شکل ۱. بررسی اثر عصاره کلرلا ولگاریس بر باکتری استرپتوکوکوس موتانس در محیط مولر هینتون اگار +۵٪خون گوسفندی. در روش انتشار دیسک و چاهک. ۱: چاهک در غلظت ۰,۱mg/µl میکرولیتر، ۲: کنترل مثبت (آمپی‌سیلین)، ۳: دیسک در غلظت ۲/۵ mg، ۴: کنترل منفی (حلال، شامل استن، کلروفورم، متانول).

بحث و نتیجه‌گیری

میانگین قطر هاله‌های عدم رشد در روش دیسک در مورد کنترل مثبت (آمپی‌سیلین) به صورت معناداری، بیشتر از هاله

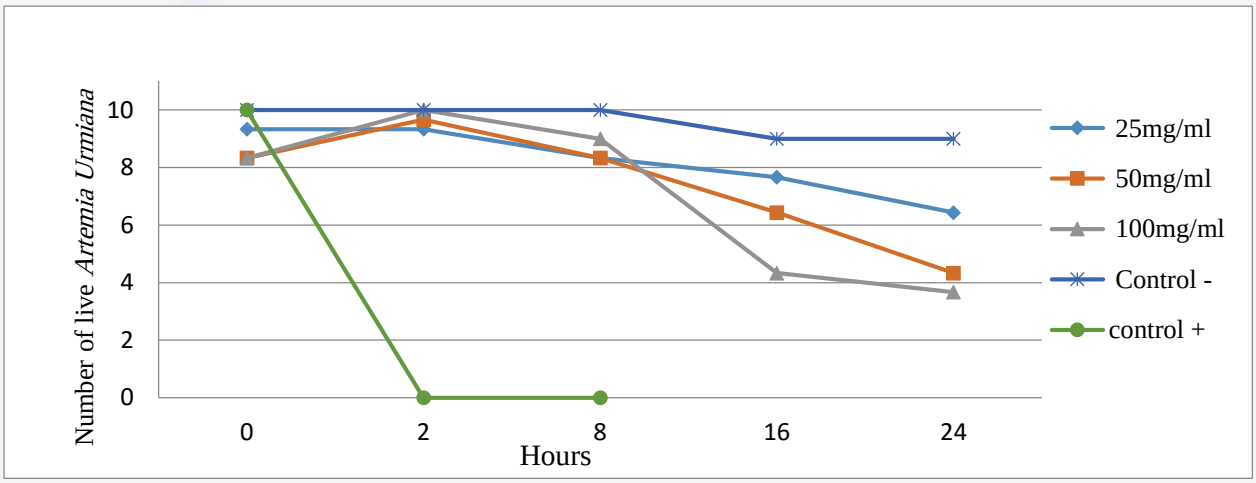
عدم رشد در مورد عصاره کلرلا ولگاریس می‌باشد (p= ۰/۰۱۱). با این وجود در دیسک بارگذاری شده با غلظت ۲/۵ میلی‌گرم به طور میانگین هاله‌ی عدم رشدی به میزان ۰/۵ ± ۱۶/۵ میلی‌متر گزارش شد (جدول ۱).

در روش چاهک اختلاف معناداری بین خواص ضد میکروبی عصاره کلرلا ولگاریس و آمپی‌سلین به عنوان کنترل مثبت وجود ندارد (p=۰/۵۲). می‌توان بیان داشت این عصاره پتانسیلی شبیه آمپی‌سیلین در جلوگیری از رشد استرپتوکوکوس موتانس دارد (جدول ۱).

در پژوهشی که رضا صفری و همکاران روی خاصیت ضد میکروبی عصاره کلرلا ولگاریس بر باکتری باسیلوس سوبتیلس در روش انتشار دیسک انجام دادند، دست یافتند که عصاره‌ی اتانولی جلبک کلرلا ولگاریس با ایجاد هاله‌ی عدم رشدی به قطر ۰/۹۲ ± ۱۰/۵۶ میلی‌متر باعث کاهش معنی‌دار رشد باسیلوس سوبتیلیس شده است و عصاره‌ی استونی کلرلا ولگاریس نیز در روش دیسک قطر هاله عدم رشدی برابر با ۰/۷۵ ±۱۴/۲ میلی‌متر می‌دهد (۲۴). قطر بزرگتر هاله عدم رشد در مطالعه صورت گرفته نسبت به پژوهش‌های قبلی موید اثر ضد میکروبی ریز جلبک

جدول۱. بررسی آماری قطر هاله عدم رشد عصاره ریز جلبک کلرلا ولگاریس در آزمون انتشار دیسک و انتشار چاهک در مقایسه با آمپی‌سیلین (کنترل مثبت).

	غلظت کلرلا ولگاریس	تکرار	میانگین (میلی متر)	انحراف معیار (میلی متر)	خطای استاندارد میانگین (میلی متر)	سطح معنی داری (p-value)
هاله عدم رشد	mg Ch.v. 2.5 در روش دیسک	۳	۱۶/۵	۰/۰۵ ۰/۹۱ ±	۰/۹۸ ±۰/۴	۰/۰۱
	Ch.v 0.1mg/µl در روش چاهک	۳	۲۳	۱± /۹۱	۰/۹۸ ±۰/۶	۰/۵۲



نمودار۱ . آزمون بررسی سمیت عصاره‌ی ریز جلبک کلرلا ولگاریس بر میگوی آب شور بومی دریاچه ارومیه. نمودار LC_{50} لارو آرتمیا ارومیانا بر حسب ساعت.

کلرلا ولگاریس بر باکتری استرپتوکوکوس موتانس همانند کلرلا ولگاریس بر باکتری باسیلوس سوبتبلیس می‌باشد.

در پژوهشی که در سال ۲۰۱۳ توسط Ghanaim fasya بر خاصیت ضد میکروبی عصاره متانولی ریز جلبک کلرلا ولگاریس انجام گرفت، روشن نمود که عصاره کلرلا ولگاریس به قطر هاله عدم رشد ۹/۹ mm بر علیه اشیرشیا کولی و به قطر هاله عدم رشد ۱۲ میلی‌متر بر علیه استافیلوکوکوس اورئوس را از خود نشان داد. با اشاره به همین پژوهش، ترکیبات فلاونوئید، تانن، کارتنوئید، ترکیبات فنولی، ترپنوئید و کلروفیل که در حلال‌های آلی مختلف وجود دارد، خصوصیات متفاوتی را از خود در برابر میکروارگانیسم‌ها نشان می‌دهد و همین مساله توجیه کننده قطر هاله‌های متفاوت در عصاره‌های گرفته شده با کمک حلال‌های مختلف از این ریز جلبک می‌باشد (۲۳).

در پژوهشی که در سال ۲۰۱۴ توسط گروه Krishna Khairnar روی خاصیت ضد میکروبی دو گونه ریزجلبکی کلرلا ولگاریس و کلامیدوموناس بر علیه پاتوژن‌های مهم کلینیکی Staphylococcus aureus،Streptococcus pneumoniae Acinetobacter baumanii , Salmonella , Escherichia coli , Klebsiella spp.،Pseudomonas aeruginosa (۲۵) صورت پذیرفت، نشان داده شد که عصاره اتانولی ریز جلبک کلرلا ولگاریس دارای خاصیت ضد میکروبی بر علیه پاتوژن‌های بیماری زای Staphylococcus aureus، Streptococcus pyogenes، Bacillus cereus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa، Salmonella typhimurium و Yersinia enterocolitic می‌باشد (۲۶).

همچنین نشان داد که عصاره متانولی و اتیل استاتی ریز جلبک در برابر گونه‌های باکتریایی استافیلوکوکوس و اشیرشیا کولی موثر بودند و عصاره متانولی اثر بیشتری نسبت به عصاره اتیل استات از خود نشان داد (۲۶).

در ارزیابی حداقل غلظت مهارکننده رشد استرپتوکوکوس موتانس به روش میکرودایلوشن، عصاره کلرلا ولگاریس در غلظت‌های بالاتر از ۲۵ میلی گرم بر میلی‌لیتر در طول موج ۵۷۵ نانومتر اثر ضد میکروبی خود را نشان داد و اثر باکتریسیدال در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد. این نتیجه نشان می‌دهد که عصاره ریز جلبک کلرلا ولگاریس خواص باکتریسیدال از خود نشان می‌دهد، در واقع با افزایش ماده موثره گیاه اثر ضد میکروبی بیشتر می‌گردد. در پژوهشی که در سال ۲۰۱۲ توسط Priya. S روی خاصیت ضد میکروبی ریز جلبک سبز کلرلا ولگاریس روی چهار میکروارگانیسم Micrococcus aureus Staphylococcus, Bacillus subtilis, luteus و Klebsiella pnemoniae روی داد، هاله عدم رشد mm ۸-۱۵ و حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) ۲۵g/ml- ۴۰ µ بیان شد (۲۷).

در بررسی تشکیل بیوفیلم توسط استرپتوکوکوس موتانس در حضور عصاره‌ی کلرلا ولگاریس اختلاف معناداری بین جذب نوری کنترل مثبت و کنترل منفی دیده می‌شود (p=۰/۰۱۷) و همچنین اختلاف معناداری بین کنترل مثبت و حداکثر غلظت عصاره وجود ندارد (p= ۰/۹) که این نشان دهنده‌ی خواص عصاره این ریزجلبک در ممانعت از ساخته شدن بیوفیلم بر روی دیواره پلی‌استیرن چاهک همانند کنترل مثبت می‌باشد. در مقایسه‌ای که بین جذب نوری کنترل مثبت و سایر غلظت‌ها صورت گرفت اختلاف معناداری مشاهده گردید، که موید این مطلب است که در غلظت‌های mg/ml ۵۰ و بالاتر عصاره‌ی کلرلا ولگاریس توانایی از بین بردن بیوفیلم باکتری موتانس را دارد.

با استفاده از نتایج پژوهش‌های گذشته در زمینه بررسی و تشخیص ترکیبات ریز جلبک کلرلا ولگاریس حاصل از GC-MS دریافتند که حضور موادی مانند فلاونیدها، تانن، ساپونین، ترکیبات فنولی، کلروفیل، استروییید و ترپنوییید در حلال‌های مختلف در روش‌های متفاوت عصاره‌گیری سبب بروز خاصیت ضدمیکروبی در ریزجلبک شده است (۳۱). با توجه به حلال مورد بررسی در این آزمایش در مقایسه با پژوهش‌های گذشته می‌توان ادعا کرد که این مواد سبب بروز خاصیت بازدارندگی و ممانعت‌کنندگی از تشکیل بیوفیلم باکتری استرپتوکوکوس موتانس را داشته باشد.

در ارزیابی سمیت سلولی آرتمیا ارومیانا توسط کلرلا ولگاریس، اثر مستقیمی بین غلظت عصاره کلرلا ولگاریس و میزان مرگ و میر نوزادان آرتمیا وجود دارد و LC_{50} برای بالاترین غلظت یعنی غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نسبت به غلظت‌های پایین‌تر در بازه زمانی کوتاه‌تری اتفاق می‌افتد (نمودار ۱). همچنین با توجه به این که میزان مرگ و میر در لحظه اول،

در حلال 0.5% tween 20 صد در صد بود (نمودار ۱)، این موضوع به سمیت بالای ماده اشاره می‌کند اما در جلبک کلرلا ولگاریس اثر سمیت کمتری در دوزهای آزمایش شده مشاهده شد. با توجه به حلال مورد استفاده و به دنبال آن جداسازی و استخراج مواد فعال و ترکیبات متفاوت در روش عصاره‌گیری، اثر سمیت ضعیفی در عصاره ریزجلبکی دیده شد که این موضوع استفاده آن را در مصارف خوراکی به عنوان مکمل و دارو و مصارف دیگر را تایید می‌کند. اما در غلظت‌های بالاتر به دلیل تجمع متابولیت‌های ثانویه مانند فلاونیدها، فنول، ساپونین، تانن و کاردیاک‌گلیکوزید در عصاره ریزجلبکی سبب افزایش سمیت در ناپلی آرتمیا و در نتیجه افزایش مرگ و میر می‌گردد (۲۹-۳۱). این نکته در ارتباط با 0.5 tween 20 % عکس موضوع را ثابت می‌کند. در پژوهشی که Ghanaim Fasya در سال ۲۰۱۳ روی موضوع ارزیابی سمیت عصاره ریزجلبکی کلرلا ولگاریس بر آرتمیا سالینا انجام دادند، نشان داد که عصاره متانولی ریز جلبک کلرلا ولگاریس دارای اثر سمیت با LC_{50} برابر ۲۰/۵۱۶ ppm می‌باشد (۲۳).

ترکیب شیمیایی موجود در ریزجلبک کلرلا ولگاریس شامل کربوهیدرات ۲۰/۶٪، پروتئین ۳۰/۹٪، لیپید ۲۰/۱٪ و دیگر ترکیبات ۲۸/۴٪ می‌باشد (۲۳). همچنین کلرلا حاوی بیشترین میزان کلروفیل در بین تمام گونه‌های گیاهی شناخته شده است. این جلبک حاوی انواع ویتامین‌های A، E، B_1، B_2، C، غنی از اسیدهای چرب ضروری و دارای دیواره سلولی حاوی فیبرهای ویژه با خاصیت سم‌زدایی است. علاوه بر این در پژوهش‌های انجام گرفته ریز جلبک کلرلا ولگاریس دارای ماده‌ای با نام chlorellin است که دارای خاصیت آنتی‌بیوتیکی می‌باشد (۶). همچنین بنا به پژوهش‌های گذشته وجود موادی مانند استروئیدها، ترپنوئیدها و ترکیبات فنلی که خواص ضد میکروبی آن‌ها اثبات شده است در عصاره‌ی این ریز جلبک تاییدی بر خواص ضدمیکروبی کلرلا ولگاریس می‌باشد (۲۰، ۲۳ و ۲۵) .

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از زحمات سرکار خانم سمیه جعفری تشکر و قدردانی می‌کنیم. این پژوهش با استفاده از امکانات مالی و حمایت‌های معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی فسا به عنوان طرح پژوهشی مصوب انجام شده است.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده اند.

References

1. Taskin E, Ozturk M, Kurt O. Antibacterial activities of some marine algae from the Aegean Sea (Turkey). African journal of Biotechnology. 2007;6(24):2746-51.
2. Wigmosta MS, Coleman AM, Skaggs RJ, Huesemann MH, Lane LJ. National microalgae biofuel production potential and resource demand. Water Resources Research. 2011;47(3).
3. Kerem M, Salman B, Pasaoglu H, Bedirli A, Alper M, Katircioglu H, et al. Effects of microalgae Chlorella species crude extracts on intestinal adaptation in experimental short bowel syndrome. World journal of gastroenterology: WJG. 2008;14(28):4512.
4. Hinder SL, Hays GC, Brooks CJ, Davies AP, Edwards M, Walne AW, et al. Toxic marine microalgae and shellfish poisoning in the British isles: history, review of epidemiology, and future implications. Environmental Health. 2011;10(1):54.
5. Uma R, Sivasubramanian V, Niranjali Devaraj S. Preliminary phycochemical analysis and in vitro antibacterial screening of green micro algae, Desmococcus olivaceous, Chlorococcum humicola and Chlorella vulgaris. J Algal Biomass Utln. 2011;2(3):74-81.
6. Pratt R. Studies on Chlorella vulgaris. V. Some properties of the growth-inhibitor formed by Chlorella cells. American Journal of Botany. 1942;29(2):142-148.
7. Ahmad I, Sharma AK, Daniell H, Kumar S. Altered lipid composition and enhanced lipid production in green microalga by introduction of brassica diacylglycerol acyltransferase 2. Plant biotechnology journal. 2015;13(4):540-550.

8. Chen F, Wang D. Novel technologies for the prevention and treatment of dental caries: a patent survey. Expert opinion on therapeutic patents. 2010;20(5):681-94.
9. Ghasemi Y, Rasoul-Amini S, Naseri A, Montazeri-Najafabady N, Mobasher M, Dabbagh F. Microalgae biofuel potentials (Review). Applied biochemistry and microbiology. 2012;48(2):126-44.11. Hamada S, Slade HD. Biology, immunology, and cariogenicity of Streptococcus mutans. Microbiological reviews. 1980;44(2):331.
12. Akhbari M, Haeri MR, Babaei M. Investigation of anthocyanin contents and cytotoxic activity in different extracts of fruit peel of Solanum melongena L. Qom University of Medical Science Journal. 2014;8(3):11-17.
13. Ozaki F, Pannuti CM, Imbronito AV, Pessotti W, Saraiva L, Freitas NMd, et al. Efficacy of a herbal toothpaste on patients with established gingivitis: a randomized controlled trial. Brazilian oral research. 2006;20(2):172-7.
14. Aghai F, Mohammadi-Sichani M, Karbasizadeh V, Mofid M. Effect of Stevia rebaudiana extract on streptococcus mutans: 2013;16(1):72-79.
15. Rasoul-Amini S, Montazeri-Najafabady N, Mobasher MA, Hoseini-Alhashemi S, Ghasemi Y. Chlorella sp: A new strain with highly saturated fatty acids for biodiesel production in bubble-column photobioreactor. Applied Energy. 2011;88(10):3354-6.
16. Abbaszadegan A, Ghahramani Y, Gholami A, Hemmateenejad B, Dorostkar S, Nabavizadeh M, et al. The effect of charge at the surface of silver nanoparticles on antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative bacteria: a preliminary study. Journal of Nanomaterials. 2015;2015(2): 1-8.
17. Salehi M, Moradi S, Aghili T, Razavipour R. Search in iranian patients in Streptococcus mutans isolated I / III and II genes mutacin: Medical Science Journal of Islamic Azad University. 2012;21(2):89-96.
18. Clinical, Institute LS. Performance Standards for Antimicrobic Disc Susceptibility Tests: Approved Standard.2012;29(1):1-76.
19. Cockerill FR, Clinical, Institute LS. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing: approved standard: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 2006;29(1):1-76.
20. Galvão LCdC, Furletti VF, Bersan SMF, da Cunha MG, Ruiz ALTG, Carvalho JEd, et al. Antimicrobial activity of essential oils against Streptococcus mutans and their antiproliferative effects. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2012;2012(2012):1-12.
21. Fujiwara T, Hoshino T, Ooshima T, Hamada S. Differential and quantitative analyses of mRNA expression of glucosyltransferases from Streptococcus mutans MT8148. Journal of dental research. 2002;81(2):109-13.
22. Hisem D, Hrouzek P, Tomek P, Tomšíčková J, Zapomělová E, Skácelová K, et al. Cyanobacterial cytotoxicity versus toxicity to brine shrimp Artemia salina. Toxicon. 2011;57(1):76-83.
23. A. Ghanaim Fasya1 SA, Siti Khairul Bariyyah1, Umi Khamidah1, A. Hanapi1 Romaidi2. Toxicity, Antioxidant and Antibacterial Activity Test of Methanol Extract of Chlorella sp. Microalgae Result Cultivation in Tauge Extract Medium. 2 0 1 3;3(2):287-295.
24. SafariR, Abtahi B, Taiebi P. Evaluation effect of Chlorellavulgaris extract on Bacillus subtilis in vitro. Journal f Food Science and Technology Research. 2010;3(2):28-33
25. Najdenski HM, Gigova LG, Iliev II, Pilarski PS, Lukavský J, Tsvetkova IV, et al. Antibacterial and antifungal activities of selected microalgae and cyanobacteria. International Journal of Food Science & Technology. 2013;48(7):1533-40.
26. Sanmukh S, Bruno B, Ramakrishnan U, Khairnar K, Swaminathan S, Paunikar W. Bioactive compounds derived from microalgae showing antimicrobial activities. Journal of Aquaculture Research and Development. 2014;5(3):224.
27. Priya. S. Analysis of value–added biochemical compounds and antimicrobial activity of green algae Chlorella vulgaris. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research. 2012;4(5):2577-2579.
28. Rasoul-Amini S, Mousavi P, Montazeri-Najafabady N, Mobasher MA, Mousavi SB, Vosough F, et al. Biodiesel properties of native strain of Dunaliella Salina. International Journal of Renewable Energy Research (IJRER). 2014;4(1):39-41.
29. Rasoul-Amini S, Ghasemi Y, Morowvat MH, Mohagheghzadeh A. PCR amplification of 18S rRNA, single cell protein production and fatty acid evaluation of some naturally isolated microalgae. Food Chemistry. 2009;116(1):129-36.
30. Rasoul-Amini S, Montazeri-Najafabady N, Shaker S, Safari A, Kazemi A, Mousavi P, et al. Removal of nitrogen and phosphorus from wastewater using microalgae free cells in bath culture system. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 2014;3(2):126-31.
31. Hosseini Tafreshi A, Shariati M. Dunaliella biotechnology: methods and applications. Journal of Applied Microbiology. 2009;107(1):14-35.

Original Article

Evaluation of Chlorella Vulgaris Extract Inhibitory Effects on Growth, Proliferation and Biofilm Formation by Streptococcus Mutans and Evaluation of Its Toxicity

Jafari Sh[1,2,3], Mobasher MA[1,2,4,5*], Najafipour S[1,6], Ghasemi Y[4,5], Mobasher N[7], Naghizade MM[1], Ebrahimi MA[3]

1- Noncommunicable Diseases Research Center, Fasa University of Medical Sciences, Fasa, Iran.
2- Department of Medical Biotechnology, School of Medicine, Fasa University of Medical Sciences, Fasa, Iran.
3- Department of Agricultural Biotechnology, Payame Noor University, Tehran, Iran.
4- Department of pharmaceutical Biotechnology, School of Pharmacy, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
5- Pharmaceutical Science Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.
6- Department of Microbiology, Fasa University of Medical Sciences, Fasa, Iran.
7- Department of Biochemistry, School of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.

Received: 18 May 2015 Accepted: 07 Jul 2015

Abstract

Background & Objectives: Dental caries is the most important disease caused by some bacteria specially Streptococcus Mutans from Viridans family. The aim of this study is to evaluate the inhibitory effect of Chlorella vulgaris extract on growth, proliferation, and biofilm formation of Streptococcus mutans.

Materials & Methods: Microalgae Chlorella vulgaris was extracted via maceration using chloroform, methanol, and acetone (2/1/1) as solvents. The antibacterial activities were evaluated through methods such as disk diffusion, well diffusion, minimal inhibitory concentration (MIC), and minimal bactericidal concentration (MBC); besides, the anti-biofilm formation of Chlorella vulgaris extract was indicated. In the present study, a method utilizing brine shrimp lethality was used to screen the toxicity of Chlorella vulgaris extract, and the mortality of brine shrimps was counted by Magnifying glass in a 24-hour period.

Results: The results of disc diffusion and well diffusion of Chlorella vulgaris extract revealed the averages of 16.5 and 23 mm zones of inhibition in Mueller-Hinton agar, respectively. The minimal inhibitory concentration was 25 mg/ml and the minimal bactericidal concentration was 50 mg/ml. The anti-biofilm formation concentration of Chlorella vulgaris extract was 50 mg/ml, and the concentration of brine shrimp toxicity was100 mg/ml.

Conclusion: The present study showed that Chlorella vulgaris extract has more significant antimicrobial properties than ampicillin and is able to eliminate Streptococcus mutans biofilm.

Keywords: **Streptococcus mutans, Chlorella vulgaris, Dental caries, Artemia Urmiana, Biofilm**

*** Corresponding author: Mohammad Ali Mobasher,** Noncommunicable Diseases Research Center, Fasa University of Medical Sciences, Fasa, Iran.
Email: mobasherm@sums.ac.ir

Journal of Fasa University of Medical Sciences/ Autumn 2015/ Vol.5/ No.3/ P. 387-396