مقاله تحقیقی

بررسی اثر اسانس آویشن شیرازی علیه بیوفیلم سویه های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس

مهسا خدایی[1]، معصومه مهدوی اورتاکند[2,*]، سحر هنرمند جهرمی[1]

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین-پیشوا، ایران
۲. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین-پیشوا، ایران

***مسئول مکاتبات:** آدرس الکترونیکی: masumehmahdavi@gmail.com

محل انجام تحقیق: گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین-پیشوا، ایران

تاریخ دریافت: ۹۷/۵/۲ تاریخ پذیرش: ۹۷/۶/۱۲

فصلنامه علمی پژوهشی دانش زیستی ایران
جلد ۱۲- شماره ۱- بهار ۱۳۹۷

چکیده

استافیلوکوکوس اورئوس از عوامل مهم در عفونت‌های بیمارستانی است که در سال‌های اخیر به درمان آنتی بیوتیکی مقاومت نشان داده است. یکی از دلایل این امر توانایی تولید بیوفیلم توسط این باکتری‌ها است. یکی از روش‌های پیشنهادی برای مقابله با بیوفیلم باکتری‌ها، استفاده از درمان‌های ضد باکتریایی جایگزین است که شامل ترکیبات ضد میکروبی طبیعی مانند اسانس‌های گیاهی می‌باشد. هدف از این مطالعه، بررسی اثر ضد میکروبی اسانس *Zataria multiflora* برعلیه بیوفیلم سویه‌های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس می‌باشد. در این مطالعه ۱۰ سویه بالینی استافیلوکوکوس اورئوس از نمونه‌های مختلف انتخاب شد و توانایی آنها برای تشکیل بیوفیلم براساس اتصال به سطوح پلیمری مورد ارزیابی قرار گرفت. حداقل غلظت بازدارنده بیوفیلم اسانس آویشن شیرازی، روی میکروتیترپلیت پلی استرنی بررسی و تعیین شد. بر اساس نتایج به دست آمده در این تحقیق، ۶ سویه *S. aureus* قادر به تشکیل بیوفیلم پایدار بودند و اسانس *Z. multiflora* مانع تشکیل بیوفیلم استافیلوکوکوس اورئوس شد. این مطالعه نشان می‌دهد که می‌توان از اسانس هاس گیاهی جهت کنترل بیوفیلم‌ها استفاده نمود. این مساله بر اهمیت ترکیبات طبیعی به عنوان عوامل ضد بیوفیلمی و ضدمیکروبی بالقوه تاکید می‌کند.

واژه‌های کلیدی: اسانس آویشن شیرازی، بیوفیلم، استافیلوکوکوس‌اورئوس، اثر ضد میکروبی

مقدمه

استعداد بالای سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس در کسب ژنهای مقاومت آنتی بیوتیکی از سایر باکتری‌ها و در نتیجه افزایش مقاومتهای آنتی بیوتیکی در کنار قدرت بالای بیماری زایی و ایجاد بیوفیلم به یک نگرانی عمده در سلامت بیماران مبدل شده است (۱،۲). بیوفیلم باکتری‌ها شامل تجمعاتی از میکروارگانیسم‌ها، محصولات خارج سلولی و مواد موجود در فضای بین آنها است که به یک سطح متصل شده‌اند. بیوفیلم‌ها به دلیل ساختار خاص خود و وجود مواد پلیمری خارج سلولی باعث کاهش نفوذ عوامل ضد میکروبی می‌شوند. درمان عفونت‌های ناشی از باکتری‌های مولد بیوفیلم سخت و پزشکان با معضلات زیادی در این زمینه روبرو هستند. به دلیل خواص متمایز و نقش بیوفیلم‌ها در کاهش نفوذ دارو به داخل سلولهای باکتریایی، باکتری‌های مولد بیوفیلم مقاومت دارویی زیادی داشته و نیاز به استفاده از روشهای درمانی متفاوتی برای درمان این نوع عفونت‌ها وجود دارد (۳،۴،۵،۱۰). بیوفیلم‌ها به علت توانایی بالای جمعیت‌های باکتریایی در سازش با تغییرات محیط نسبت به آنتی بیوتیک‌ها بسیار مقاوم شدند به طوری که بعضی از محققین ادعا می‌کنند مقاومت

استفاده بی رویه آنتی بیوتیک‌ها جهت درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری باشد. یکی از راه های مبارزه با بیوفیلم استفاده از داروهای گیاهی به جای آنتی بیوتیک است. اسانس‌های گیاهی، ترکیبات پیچیده ای از اجزای مختلف شیمیایی با مقادیر گوناگون می‌باشند. خواص ضد میکروبی اسانس‌های گیاهی شناخته شده است. از ویژگی‌های مهم اسانس‌ها و اجزای تشکیل دهنده آنها خاصیت آبگریزی آنها می‌باشد که موجب نفوذ این مواد به لیپیدهای غشا سلول باکتری و میتوکندری‌ها می‌شود و سبب اختلال در ساختمان‌های آنها و ایجاد نفوذپذیری بیشتر می‌گردد. این مسئله موجب خروج و نشت یون‌ها و دیگر محتویات سلولی می‌شود . با توجه به این تاثیرات بیولوژیک، اسانس‌ها به عنوان جایگزین مناسب برای آنتی بیوتیک‌ها با اهداف درمانی مورد توجه هستند (۶). آویشن شیرازی با نام علمی *Zataria multiflora* گیاهی از خانواده نعناعیان است. بر اساس مطالعات قبلی مشخص شده است که اسانس آویشن شیرازی می‌تواند از رشد اشریشیاکلی انتروهموراژیک، استافیلوکوکوس اورئوس، انتروکوکوس و همچنین سودوموناس آئروژنوزا، اسینتوباکتر بومانی، آلکالیژنز و کریزئوباکتریوم مننگوسپتیکوم جلوگیری به عمل آورد و مطالعات نشان می‌دهد که عصاره الکلی آن می‌تواند مانع رشد سویه‌هایMRSA شود (۷، ۱۳ و ۱۴). این مطالعه با هدف مطالعه اثر اسانس گیاه آویشن شیرازی برعلیه بیوفیلم سویه‌های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس انجام گردید.

مواد و روش ها

در این مطالعه تعداد ۱۰ سویه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس از نمونه‌های بالینی بیماران مراجعه کننده به بیمارستان پیامبر اکرم (ص) در بهار ۱۳۹۵، جمع‌آوری شد و نمونه‌ها توسط تست‌های بیوشیمیایی افتراقی مورد بررسی قرار گرفت. نمونه استاندارد باکتریایی مورد مطالعه در این تحقیق (ATCC 25923) *Staphylococcus aureus* بود که به صورت لیوفیلیزه از کلکسیون میکروبی ایران در انستیتیو پاستور خریداری شد. تمام تست های افتراقی عبارتند از: رنگ آمیزی گرم، تست کاتالاز، تست کواگولاز، کشت باکتری در محیط مانیتول سالت آگار و تست DNase جهت شناسایی استافیلوکوکوس اورئوس انجام شد.

روش تهیه اسانس آویشن شیرازی

به منظور تهیه اسانس از سرشاخه‌های گیاه آویش شیرازی خشک شده استفاده شد. ۲۰۰ گرم از پودر گ خشک پس از توزین با دستگاه کلونجر به مدت ۳ ساع اسانس‌گیری شد. نمونه‌های آماده شده توسط دستگ کروماتوگرافی گازی توام با طیف‌سنجی جرمی (GC-MS تزریق گردید. از آنجایی که ترکیبات موجود در اسانس به لحاظ وزن مولکولی و قطبیت بعنوان مواد فرار شناخت می شوند از این رو عمل جداسازی و شناسایی ترکیبا متشکله اسانس بدست آمده توسط روش کروماتوگرافی گازی توام با طیف سنجی جرمی انجام گردید. طیف های جرمی بدست آمده از دستگاه GC-MS با طیف های جرم استاندارد موجود در منابع مقایسه گردید (۱۵). استوک اول اسانس آویشن شیرازی با رقت ۵۱۲۰ میکرولیتر بر میلی‌م توسط محلول DMSO ۵ درصد رقیق شد. سپس جه استریل کردن، از فیلترهای میکروبی سرسرنگی ۲ میکرون عبور داده شد. این استوک برای استفاده در مراح بعد در یخچال نگهداری شد.

بررسی تشکیل بیوفیلم ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس به روش میکروتیترپلیت

قدرت تشکیل بیوفیلم ۱۰ سویه استافیلوکوک اورئوس به روش میکروتیترپلیت بررسی شد سویه‌های فر شده روی محیط بلاد آگار کشت داده شد و پس از ۴ ساعت انکوباسیون روی TSA کشت و بعد از ۲۴ ساع انکوباسیون به درون TSB تلقیح شدند. سپس ۰۰ میکرولیتر از این سوسپانسون به چاهک‌های میکروپلی پلی استرنی ۹۶ خانه ای اضافه شد. در مرحله بعد پلیت برای خوانش توسط الایزاریدر رنگ آمیزی شد. برای ای منظور چاهک‌ها با ۲۰۰ میکرولیتر بافر PBS شسته شدن باکتری های چسبیده با ۲۰۰ میکرولیتر متانول ۹۹ درص فیکس شدند.۲۰۰ میکرولیتر کریستال ویوله ۲٪ چاهک‌ها اضافه شد و در نهایت پس از رنگ بری توس اسید استیک OD چاهک ها در طول موج ۵۷۰ توس الایزاریدر خوانده شد. این آزمون با سه بار تکرار برای د نمونه باکتری صورت گرفت و یک چاهک حاوی محی کشت خالی که همان محیط کشت تریپتیکاز سوی برا حاوی ٪۲ گلوکز بود به عنوان کنترل منفی در نظر گرفت

شد. جهت کنترل مثبت در این آزمایش از سویه *Staphylococcus aureus* ATCC 27853 استفاده گردید. جهت بررسی توانایی تشکیل بیوفیلم سویه‌ها، از روش تعیین معیار طبقه بندی مقادیر جذب نوری یا ODc استفاده شد. ODc از رابطه میانگین OD کنترل منفی به اضافه ۳ برابر انحراف معیار کنترل منفی به دست آمد. سویه‌ها بر اساس جدول زیر از نظر بیوفیلم به چهار گروه تقسیم شدند (۱۶ و ۱۷). OD اندازه‌گیری شده به منظور توانایی تشکیل بیوفیلم سویه‌ها در نظر گرفته می‌شود که با Standard deviation calculator با فرمول و الگوی جدول زیر انجام و مقایسه شد.

جدول ۱: تشکیل بیوفیلم بر اساس OD اندازه‌گیری شده در چاهک‌ها.

تولید بیوفیلم	میانگین OD
بیوفیلم منفی	OD ≤ ODc
بیوفیلم ضعیف	ODc < OD ≤ 2 x ODc
بیوفیلم متوسط	2 x ODc < OD ≤ 4 x ODc
بیوفیلم قوی	4 x ODc < OD

ODc (Optical density cut-off value): میانگین OD کنترل منفی+ سه برابر انحراف معیار (SD) کنترل.

تعیین حداقل غلظت بازدارنده بیوفیلم اسانس آویشن شیرازی علیه سویه‌های بیوفیلم قوی استافیلوکوکوس اورئوس

برای تعیین حداقل غلظت بازدارنده بیوفیلم اسانس آویشن شیرازی بر علیه ۶ سویه بیوفیلم قوی از روش میکرودایلوشن براث و با استفاده از میکروتیترپلیت پلی استرنی بررسی و تعیین شد. به این منظور ۱۰۰میکرولیتر از رقت های ۲۵۶ تا ۰/۱۲ میکرولیتر بر میلی لیتر از اسانس در چاهک های میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای ریخته شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی که به وسیله محیط کشت مولر هینتون براث ۱ به ۱۰۰ رقیق شده بود به هر چاهک اضافه شد. در این آزمون به منظور کنترل منفی، از محیط کشت خالی (بدون اسانس و سوسپانسیون میکروبی) استفاده گردید. به منظور کنترل زمینه از اسانس و محیط کشت (بدون سوسپانسیون میکروبی) استفاده شد. یک چاهک هم به منزله کنترل DMSO (محیط کشت و سوسپانسیون میکروبی به همراه DMSO ۵ درصد) در نظر گرفت شد. همچنین سوسپانسیون میکروبی و محیط کشت بدون اسانس به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. حجم نهایی تمام چاهک‌ها ۲۰۰ میکرولیتر بود. میکروپلیت ها به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. پس از این مدت پایین‌ترین غلظتی که در آن هیچگونه رشد باکتری مشاهده نشد به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی بیوفیلم تعیین شد. تمام مراحل برای ۶ سویه استافیلوکوکوس اورئوس دارای بیوفیلم قوی با ۳ بار تکرار انجام شد.

بررسی میزان تشکیل بیوفیلم در حضور اسانس آویشن شیرازی علیه سویه های بیوفیلم قوی استافیلوکوکوس اورئوس

سویه های دارای بیوفیلم قوی که در مراحل قبل انتخاب شد روی محیط تریپتکاز سوی آگار (TSA) کشت بعد از ۲۴ساعت انکوباسیون به درون محیط تریپتکاز سوی براث حاوی ۲٪ گلوکز (TSB) تلقیح شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از رقت های ۲۵۶ – ۰/۱۲ میکرولیتر بر میلی لیتر از اسانس به هر چاهک میکروپلیت ۹۶ خانه ای اضافه شد. سپس ۱۰۰ از سوسپانسون میکروبی تهیه شده به هر چاهک افزوده شد. کنترل منفی شامل ۱۰۰ میکرولیتر اسانس در تمام غلظت‌های مورد مطالعه اسانس به اضافه ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت TSB بدون سوسپانسیون میکروبی در یک ردیف از چاهک‌ها بود و هر آزمایش با ۳ تکرار انجام شد. در مرحله بعد میکروپلیت ها پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون برای خوانش توسط الایزاریدر رنگ آمیزی شد و OD چاهک‌ها با دستگاه الایزاریدر با طول موج ۵۷۰ اندازه‌گیری شد و به منظور توانایی تشکیل بیوفیلم سویه‌ها از روش CUT OFF استفاده شد.

نتایج

نتایج آنالیز ترکیبات تشکیل دهنده اسانس آویشن شیرازی

آنالیز ترکیبات موجود در اسانس آویشن شیرازی توسط دستگاه GC-MS انجام شد. طیف‌های مربوط به هر ترکیب تفسیر و ترکیبات عمده تشکیل دهنده اسانس شناسایی شدند. ترکیبات موجود و درصد آن به ترتیب جدول ۲ نشان داده شده است. بیشترین ترکیبات اسانس آویشن شیرازی را، تیمول با ۲۹/۱۳ درصد، کارواکرول با ۲۱/۱۰ درصد و لینالول با ۱۶/۱۴ درصد تشکیل می‌دادند.

جدول ۲ - ترکیبات و درصد موجود در اسانس آویشن شیرازی.

No	Ret Time	Compound	CAS Number	Match Quality	Area	%
1	6.457	Bicyclo[3.1.1]hept-2-ene, 2,6,6-trimethyl-	000080-56-8	97	302018617	6.097
2	10.072	.Alpha. Terpinene	000099-86-5	98	151525019	4.4562
3	11.975	Benzene, 1-methyl-4-(1-methylethyl)-	000099-87-6	97	662738817	5.1481
4	12.768	1,4-Cyclohexadiene, 1-methyl-4-(1-methylethyl)-	000099-85-4	97	511452737	6.2154
5	15.28	Linalooll	000078-70-6	96	175863602	16.4196
6	21.516	2-isopropyl-5-methyl-1-methoxybenzene	000000-00-0	94	73781600	1.0986
7	22.032	Carvacrol Methyl ether	006379-73-3	93	116276401	4.5613
8	23.345	Thymol	000089-83-8	95	2238860808	29.130
9	23.85	Carvacrol	000499-75-2	95	1927435583	21.109
10	25.667	Acetylthymol	000528-79-0	96	103347059	1.3958
11	26.932	Carvacryl acetate	000000-00-0	96	115947982	1.8944
12	28.009	Trans-Caryophyllene	000087-44-5	99	202249872	2.0015
13	30.204	Ledene	021747-46-6	99	48261073	0.3186
14	33.797	8,9-Dehydro-neoisolongifolene	000000-00-0	80	42250532	0.4291
15	35.615	Caryophyllene oxide	001139-30-6	91	43980845	0.4549
					6715990547	100

نتایج بررسی تشکیل بیوفیلم ایزوله‌های جمع آوری شده استافیلوکوکوس اورئوس

۱۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس جمع‌آوری شده از نظر تشکیل بیوفیلم مورد بررسی قرار گرفتند و نتایج در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه الایزاریدر خوانش شد. پس از خوانش OD از طریق Standard deviation calculator نتایج بیوفیلم به روش CUT OFF به تفکیک مشخص شد. بر اساس میانگین اعداد خوانده شده توسط دستگاه الایزاریدر با طول موج ۵۷۰ نانومتر، از ۱۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس ۶ سویه، شماره ۱ تا (۶۰٪) بیوفیلم قوی تشکیل داده‌اند (شماره ۱ تا ۶) و ۴ سویه (۴۰٪) بیوفیلم متوسط را تشکیل داده‌اند. در این بررسی هیچ سویه ای با بیوفیلم ضعیف و منفی گزارش نشد.

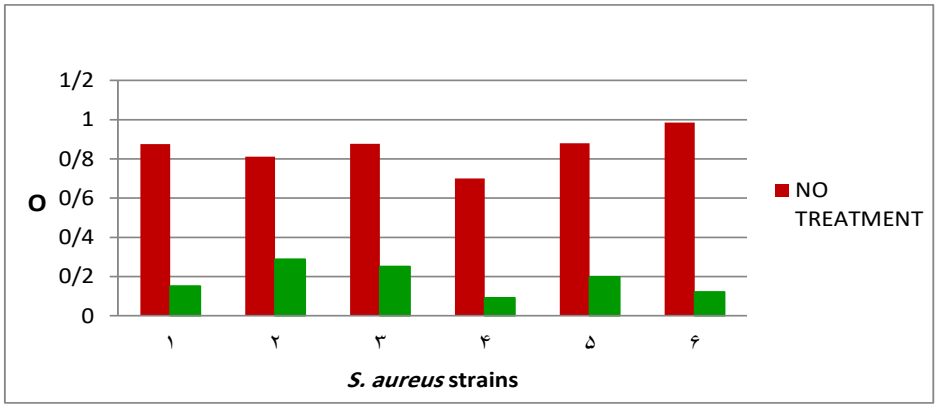
نتایج بررسی میزان تشکیل بیوفیلم استافیلوکوکوس اورئوس در حضور اسانس آویشن شیرازی به روش میکروتیترپلیت

پس از جداسازی ۶ سویه استافیلوکوکوس اورئوس بیوفیلم قوی، این سویه‌ها را از نظر تأثیر اسانس آویشن شیرازی مورد بررسی قرار گرفت. حداقل غلظت بازدارنده بیوفیلم آویشن شیرازی به روش میکرودایلوشن براث تعیین شد و برای ۶ سویه مورد بررسی بین ۶۴- ۴ میکرولیتر بر میلی لیتر حاصل شد (جدول ۳). همچنین در چاهک‌های کنترل محیط کشت، کنترل زمینه، کنترل DMSO هیچ کدورتی مشاهده نشد. چاهک کنترل مثبت کدر بود که حاکی از رشد باکتری‌ها می‌باشد. نتایج در جدول ۳ و نمودار شکل ۱ گزارش شده است. بر اساس داده های به دست آمده، تمام سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس با بیوفیلم

قوی وقتی تحت تاثیر اسانس قرار گرفتند، قدرت تشکیل بیوفیلم خود را از دست دادند و بیوفیلم آنها منفی شد.

جدول ۳- قدرت تشکیل بیوفیلم استافیلوکوکوس اورئوس در حضور اسانس آویشن شیرازی.

شماره سویه	MIC اسانس آویشن شیرازی (µl/ml)	OD در حضور اسانس آویشن شیرازی	قدرت تشکیل بیوفیلم در حضور اسانس
۱	۸	۰/۱۵۱	منفی
۲	۴	۰/۲۸۹	منفی
۳	۶۴	۰/۲۵۱	منفی
۴	۴	۰/۰۹۲	منفی
۵	۸	۰/۱۹۸	منفی
۶	۸	۰/۱۲۲	منفی



شکل ۱- نمودار قدرت تشکیل بیوفیلم استافیلوکوکوس اورئوس قبل (No Treatment) و بعد از تاثیر اسانس آویشن شیرازی (EO).

فصلنامه علمی پژوهشی دانش زیستی ایران
جلد ۱۲- شماره ۱- بهار ۱۳۹۷

بحث

بیوفیلم باکتری، از باکتری‌های محصور در ساختار آلژینات به وجود آمده که در طی اتصال به سطح ایجاد می‌شود و سبب مقاومت آنتی‌بیوتیکی و پایداری در برابر سیستم ایمنی و فاگوسیت‌ها می‌گردد (۱۸). در گذشته تصور می‌شد که عوامل ضدمیکروبی و آنتی‌بیوتیک‌ها باعث اختلال در سیستم متابولیکی بیوفیلم و تضعیف آن می‌شوند اما طیف وسیعی از بیوفیلم‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها پاسخ نمی‌دهند معمولاً با مصرف یک دوره آنتی‌بیوتیک، عفونت فروکش می‌کند اما نشانه‌های بالینی عفونت‌های ایجاد شده توسط بیوفیلم اغلب پس از مصرف یک دوره از آنتی‌بیوتیک‌ها و قطع آن، دوباره بروز می‌کند (۱۹). افزایش روز افزون مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری‌ها و ناکارآمد شدن درمان‌های رایج، نیاز به کشف راهکارهای جدید ضدمیکروبی را ایجاد کرده است. پژوهش حاضر با هدف بررسی اثر اسانس گیاه آویشن شیرازی بر مهار تشکیل سلول‌های بیوفیلم باکتری استافیلوکوکوس اورئوس، دارای بیوفیلم قوی، انجام گرفت. ترکیبات اسانس مورد مطالعه، پس از استخراج، با استفاده از روش MS-GC آنالیز شد. بیشترین ترکیبات اسانس آویشن شیرازی را، تیمول با ۱۳/۲۹ درصد، کاراکرول با ۱۰/۲۱ درصد و لینالول با ۱۴/۱۶ درصد را دارا بود. در بررسی‌های مختلف مهمترین ترکیب‌های شیمیایی اسانس آویشن شیرازی مطالعه شده است که مهم‌ترین ترکیبات آن را تیمول و کارواکرول و به ترتیب بین ۷۰-۳۰ درصد اسانس و ۳۰-۱۵ درصد اسانس را به دست آورده‌اند. در مطالعات مختلف ترکیب‌های شیمیایی اسانس آویشن شیرازی بررسی شده است که از آن جمله می توان به تحقیق صادق زاده و همکارانش اشاره

نمود که ۱۳ ترکیب در اسانس آویشن شیرازی شناسایی نمودند که عمده‌ترین آن تیمول ۵۲/۴ ٪، گاماترپینن ۱۷/۱ ٪، پاراسیمین ۱۳/۲ ٪ و کاراکرول ۶/۱ ٪ را تشکیل می داد (۸). مکانیسم اثر کارواکرول و تیمول به عنوان ترکیبات اصلی اسانس آویشن شیرازی بسیار مورد توجه محققین قرار گرفته است. تیمول و کارواکرول بسیار به یکدیگر شبیه بوده و تفاوت آنها در داشتن گروه هیدروکسیل در جایگاه‌های مختلف در حلقه فنلی است و هر دو موجب افزایش نفوذپذیری غشاء سلول می‌گردند. این دو ترکیب قادرند غشاء خارجی باکتری‌ها را تخریب کنند و موجب خارج شدن لیپوپلی ساکارید (LPS) و افزایش نفوذپذیری سیتوپلاسمی به (ATP آدنوزین تری فسفات) شوند. مطالعات نشان داده است که غشاء در حضور کارواکرول فوراً دچار این افزایش سیالیت می‌گردد. مشخص شده است که سطح ATP داخل سلولی کاهش می‌یابد که یا به علت کاهش سنتز و یا به علت افزایش هیدرولیز ATP می‌باشد . گرادیان pH تضعیف شده و در حضور مقادیر بیشتر کارواکرول کاملا از بین می‌رود .علاوه بر این سطح داخل سلولی یون‌های پتاسیم کاهش یافته در حالیکه میزان این یون در خارج سلول به طور متناوب افزایش می‌یابد .به نظر می‌رسد که کارواکرول در سراسر غشاء ایجاد کانال‌هایی می‌کند که اجازه خروج از سیتوپلاسم را می‌دهد (۲۰ و ۲۱).

نتایج بررسی تشکیل بیوفیلم باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس‌های جدا شده از نمونه‌های بالینی نشان داد که از میان ۱۰ سویه مورد بررسی ۶ سویه دارای بیوفیلم قوی و ۴ دارای سویه بیوفیلم متوسط بودند. Bendouah در سال۲۰۰۶ گزارش داد که از ۱۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس مورد مطالعه، ۸ ایزوله قدرت تشکیل بیوفیلم را داشتند. همه این ایزوله‌ها از بیماران مبتلا به سندروم سرخجه مادرزادی جدا شده بودند (۲۲). در مطالعه Hassan در سال۲۰۱۱ به روش میکروتیتر پلیت به عنوان یک روش مناسب برای بررسی تولید بیوفیلم استافیلوکوکوس اورئوس در نظر گرفته شد و در میان سویه های مورد مطالعه ۲۲/۷٪ بیوفیلم قوی، ۴۱ ٪ متوسط و ۳۶ ٪ ضعیف یا فاقد بیوفیلم تشخیص داده شدند (۲۳). در تحقیقی که Poliana در سال ۲۰۱۳، گزارش داد ۹۸/۹ ٪ از ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس مورد مطالعه با روش میکروتیتر پلیت تشکیل بیوفیلم دادند و تنها یک سویه قدرت تشکیل بیوفیلم را نداشت (۲۴). رحیمی در سال۱۳۹۴ به بررسی تولید بیوفیلم استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از افراد سالم با روش کمی میکروتیتر پلیت پرداخت. در مجموع ۷۹ سویه استافیلوکوکوس اورئوس از افراد سالم جدا گردید که ۵۳ سویه به عنوان سویه‌های مولد بیوفیلم و ۲۶ سویه نیز به عنوان بیوفیلم منفی شناسایی شدند (۱). در ادامه مطالعه، برای تعیین حداقل غلظت بازدارنده (MIC) اسانس آویشن شیرازی بر روی ۶ استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده با روش میکرودایلوشن براث انجام گرفت و MIC آن بین۴ تا ۶۴ میکرولیتر بر میلی‌لیتر حاصل شد. متوسل و همکارانش در سال ۱۳۹۳ اثر ضد میکروبی عصاره آویشن شیرازی بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین را مطالعه نمودند و نشان دادند که عصاره آویشن شیرازی در غلظت بین ۲ تا ۱۶ میکروگرم بر میلی لیتر، قادر به ممانعت از رشد این باکتری‌ها می‌باشد. عزیزخانی و همکاران در سال ۱۳۹۱ پژوهش خود را بر روی حداقل غلظت بازدارنده رشد (MIC) و حداقل غلظت باکتری کشی (MBC) اسانس آویشن شیرازی برای استافیلوکوکوس اورئوس انجام دادند. نتایج نشان داد که MIC و MBC اسانس آویشن شیرازی به ترتیب ۰/۰۳ و۰/۰۴ درصد می باشد (۹).

در نهایت میزان مهار بیوفیلم سویه های مورد بررسی در حضور اسانس آویشن شیرازی تعیین شد و که تمام سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس با بیوفیلم قوی وقتی تحت تاثیر اسانس مورد نظر قرار گرفتند، توانایی تشکیل بیوفیلم خود را از دست دادند. Al-Shuneigat و همکارانش (۲۰۱۴) اثر اسانس آویشن وحشی *Thymus vulgaris* در مهار سلولهای پلانکتونیک و تشکیل بیوفیلم سویه‌های بالینی باکتری‌های مختلف از جمله استافیلوکوکوس اورئوس مطالعه نمودند و به این نتیجه رسیدند که این اسانس می‌تواند در مهار بیوفیلم این باکتریها به طور معنا داری موثر باشد (۲۵). Chamdit و همکارانش اثر سینرژیک اسانس گیاه میخک و علف لیمو را روی سلولهای پلانکتونی و بیوفیلم استافیلوکوکوس اورئوس بررسی نمودند. نتایج این تحقیق نشان داد که اسانس این گیاهان اثر قابل توجهی در مهار تشکیل بیوفیلم استافیلوکوکوس اورئوس دارد و می‌تواند در درمان عفونتهای ناشی از این باکتری موثر باشد (۲۶). Nostro و همکارانش در سال ۲۰۰۷ اثر سینرژیک اسانس‌های کارواکرول، اورگانو و تیمول را در تشکیل بیوفیلم استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوکوس

اپیدرمیس مطالعه نمودند. بر اساس داده‌های به دست آمده از این تحقیق غلظت زیر MIC این ترکیبات می‌تواند موجب مهار بیوفیلم این باکتری‌ها شود (۲۷). تلاش محققان جهت معرفی ترکیبات با خاصیت ضد بیوفیلمی منجر به شناخت ترکیبات گیاهی شده است که به صورت طبیعی گیاهان برای محافظت از خود در برابر استقرار باکتریایی از آنها استفاده می‌کنند. ترکیبات گیاهی از راه-های مختلفی میتوانند بیوفیلم را مهار کنند، گیاهانی که ترکیبات آنها برای باکتری‌ها خاصیت کشندگی یا مهارکنندگی رشد دارد باعث مهار یا کاهش تشکیل بیوفیلم باکتریایی می‌شود. اما برخی از ترکیبات گیاهی بدون کشتن یا مهار رشد باکتری روی بیوفیلم تأثیر می‌گذارد. مزیت این ترکیبات این است که باکتری‌ها به آنها مقاوم نمی‌شوند (۲۸). به عنوان مثال برخی از ترکیبات گیاهی با تداخل و مهار سیستم حد نصاب در باکتری باعث مهار بیوفیلم این می‌شود (۲۹). از طرفی هر ماده‌ای که در چسبیدن و تعامل باکتری با سطح اختلال ایجاد کند می‌تواند به صورت بالقوه به عنوان یک ترکیب ضدبیوفیلمی عمل کند. مشخص شد که عصاره گیاهان *Echinacea angustifolia*، *Mentha piperita* و *Rosmarinus officinalis* باعث مهار بیشتر از ۱۰ درصدی چسبیدن باکتری سودوموناس آئروژینوزا به سطح می‌شوند (۳۰). نتایج تحقیق حاضر نشان داد که اسانس آویشن شیرازی می تواند مانع از تشکیل بیوفیلم در سویه های استافیلوکوکوس اورئوس گردد و می‌تواند جایگزین مناسبی در درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری باشد.

تقدیر و تشکر

مطالعه حاضر مستخرج از پایان نامه کارشناسی ارشد رشته میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین-پیشوا می باشد.

منابع مورد استفاده

۱. رحیمی، ف.، ۱۳۹۴. تولید بیوفیلم در میان سویه های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از افراد سالم. فصلنامه بیماری های عفونی و گرمسیری وابسته به انجمن متخصصین بیماری های عفونی و گرمسیری ۶۸: ۲۱- ۲۹.

۲. ملاعباس‌زاده م.، مبین ه. و میرزایی ح.، ۱۳۹۰. تعیین میزان شیوع و الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از بیماران بیمارستان امام رضا در مشهد و تبریز. مجله علمی پژوهشی زیست فناوری میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی دوره سوم ۹: ۴۵ -۵۰.

۳. تاجیک س. و نجار پیرایه ش.، ۱۳۹۴. اهمیت بالینی و ویژگی‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین اکتسابی از جمله (CA_MRSA). فصلنامه آزمایشگاه و تشخیص ۷ (۲۷): ۵۶-۶۸.

۴. چوپانی ع.، گل‌محمدی ر.، رفعتی‌ح. و ایمانی‌فولادی ع.، ۱۳۹۱. فراوانی سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از عفونت‌های منجر به زخم و تعیین الگوی حساسیت دارویی در بیماران مراجعه کننده به بیمارستان بقیه الله عج تهران ۱۳۸۵_۸۶. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی گرگان ۱۴(۳): ۱۴۰-۱۳۵.

۵. حسن نژاد بی بالان م.، جاوید ن.، صامت م.، شاکری ف. و قائمی ع.، ۱۳۹۴. مقایسه میزان تشکیل بیوفیلم با برخی از شاخص‌های فنوتیپی و ژنوتیپی استافیلوکوکوس اورئوس. مجله علوم آزمایشگاهی دانشکده پیراپزشکی گرگان ۸ (۳):۱-۷.

۶. شهینا، م. و خاکسار، ر.، ۱۳۹۱. بررسی اثر ضد میکروبی و روشهای تعیین حداقل غلظت بازدارندگی اسانس های گیاهی بر باکتری های پاتوژن. مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران ۷ (۵): ۹۴۹-۹۵۵.

۷. متوسل م.، اخوت م.، زمردیان ک. و فرشاد ش.، ۱۳۹۳. اثر ضد میکروبی عصاره آویشن شیرازی بر استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین. طب جنوب ۱۷ (۵):۹۰۰-۹۰۶.

۸. صادق زاده، ل.، سفیدکن، ف. و اولیا پ.، ۱۳۸۵. بررسی ترکیب و خواص ضدمیکروبی اسانس آویشن شیرازی (*Zataria mulrifolra*)، پژوهش و سازندگی ۱۹(۲): ۵۲-۵۶.

۹. عزیزخانی، م.، میثاقی، ع.، آخوند زاده بستی، ا.، نصرآبادی، ح. و حسینی، ه. ۱۳۹۱. بررسی اثر اسانس آویشن شیرازی بر رشد و تولید انتروتوکسین E باکتری

استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 29213. فصلنامه گیاهان داروئی ۴: ۱۸۵-۱۹۳.

International Journal of Food Microbiology 94: 253-223.

22. Bendouah Z., Barbeau J., Hamad W.A., Desrosiers M., 2006. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* is associated with an unfavorable evolution after surgery for chronic sinusitis and nasal Ployposis. Otolaryngol Head Neck surg134: 991-996.
23. Hassan A., Usman J., Kaleem F., Omair M., Khalid A., Iqbal M., 2011. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates Brazilian journal infection disease 5(4): 305-314.
24. Poliana d. C. M., Luciano M. F., Antônio N. F., Luiz F. Z., Hinig I. G. V., Viviane d. S., 2013. Comparison of methods for the detection of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis Braz J Microbiol. 44(1): 119–124.
25. Al-Shuneigat J., Al-Sarayreh S., Al-Saraireh Y., Al-Qudah M., Al-Tarawneh, I, Albataineh, E., 2014. Effects of wild Thymus vulgaris essential oil on clinical isolates biofilm-forming bacteria. IOSR Journal of Dental and Medical Sciences 13(9): 62-66.
26. Chamdit S., Siripermpool P., 2012. Antimicrobial effect of clove and lemongrass oils against planktonic cells and biofilms of *Staphylococcus aureus*. Mahidol Univ J Pharm Sci 39(2): 36-28.
27. Nostro A., Roccaro A. S., Bisignano G., Marino A., Cannatelli M. A., Pizzimenti, F. C., & Blanco, A. R., 2007. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. Journal of medical microbiology 56(4): 523-519.
28. Truchado P., Lopez-Galvez F., Gil MI., Tomas-Barberan F.A., Allende A., 2009. Quorum sensing inhibitory and antimicrobial activities of honeys and the relationship with individual phenolics. Food Chemistry 115: 1337-1344.
29. Ravichandiran V., Shanmugam K., Anupama K., Thomas S., Princy A., 2012. Structure-based virtual screening for plant-derived SdiAselective ligands as potential antivirulent agents against uropathogenic *Escherichia coli*. Eur J Med Chem 48: 200-205.
30. Sandasi M., Leonard C.M., Van Vuuren S.F., Viljoen A.M. 2011. Peppermint (Mentha piperita) inhibits microbial biofilms in vitro. South African Journal of Botany 77: 80-85.

10. Njarpyrayh S., Azimian A., Mostafaei M., 2009. Detection of *Staphylococcus aureus* resistance to methicillin by disk diffusion method to determine the MIC and PCR for mecA gene. Modares J Med. Sci Pathobiol 12 (3): 9-61.
11. Mulcahy H., Charron -Mazenod L., Lewenza S., 2008. Extracelular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance *in Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. PLoS Pathog 4(11): e1000213
12. Wangner V.E., Iglewski B.H., 2008. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in CF infection. clin Rev Allergy Immunol 35(3):124-34.
13. Kon. K. V. & Rai. M. K., 2012. Plant essential oils and their constituents in coping with multidrug-resistant bacteria. Expert review of anti-infective therapy 10 (7): 775-790.
14. Mahboubi M., Ghazian Bidgoli F., 2010. Antistaphylococcal activity of Zataria multiflora essential oil and its synergy with vancomycin. Phytomedicine 17: 548-50.
15. Adams R. P., 2001. Identification of Essential oil Components by Gas Chromatography/Quadropole Mass Spectroscopy Carol Stream IL: Allured Publishing Crop 465p.
16. Bauer A.W., Kirby M. M., Sherris J.C., Jurek M., 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single method. Am J Clin Pathol 45:493-6.
17. Stepanovic S., Vukovi D., Hola V., et al., 2007. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of bio?lm production by Staphylococci. APMIS115:891-9.
18. Davey M. E. O, Toole G. A., 2000. Microbiol biofilms; from ecology to molecular genetics. Microbiol. Mol.Biol. Rev 64(4): 867-847.
19. Mah T. F. C. & O'Toole G. A., 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. Trends in microbiology 9(1): 39-34.
20. Ultee A., Bennik H.J., Moezelaar R., 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food- borne pathogen Bacillus cereus. Applied and Environmental Microbiology 68: 1568-1561.
21. Burt S., 2004. Essential Listeria, *Staphylococcus aureus* oils: their antibacterial properties and potential application in foods-a review.