Applied Biology, Volume 10, Issue 39, 2020

Research Article

Effect of Zataria multiflora and Cinnamomum Verum essential oils on biofilm formation of Staphylococcus aureus[1]

Parisa Rahmati | M.S. Student, Department of Microbiology, Biological Sciences College, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin-Pishva, Iran. microbiologist.dr.p.r@gmail.com
Fatemeh Noorbakhsh | Associate Professor, Department of Microbiology, Biological Sciences College, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin-Pishva, Iran **(Corresponding Author)**. Niloofar_noorbakhsh@yahoo.com.
Abbass Pazoki | Assistant Professor, Department of Biology, Biological Sciences College, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin-Pishva, Iran. drpazoki@yahoo.com

Abstract

Objectives: Staphylococcus aureus is an important human pathogenic bacterium and one of the pathogens that commonly causes biofilm infections in the clinic. Antibiotic resistance has spread worldwide in Staphylococcus aureus and is a serious problem for the treatment of patients. In this study, the effect of thyme essential oil of Shirazi and cinnamon on the formation of biofilm in Staphylococcus aureus strains has been investigated.

Methods: In this study, 20 clinical samples of Staphylococcus aureus were isolated from the urine of patients admitted to the intensive care unit of Taleghani Hospital in Tehran. The microdilution test was performed to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of *Zataria multiflora* and cinnamon essential oils on strains. The ability of biofilm formation in the collected strains was assessed by microtiterplate and the effects of *Zataria multiflora* and cinnamon essential oils were evaluated on biofilm formation.

Results: In this study, 75% of *Staphylococcus aureus* strains formed strong biofilm and 25% moderate biofilm. Treatment of *Staphylococcus aureus* strains with *Zataria multiflora* essential oils in MIC concentration revealed that biofilm formation were 40% weak and 60% strains did not form biofilm. Treatment of strains with cinnamon essential oil at MIC concentration was observed to be 25% strong biofilm and 75% moderate biofilm. The present study shows the effect of essential oils of *Zataria multiflora* and cinnamon in reducing the biofilm formation of *Staphylococcus aureus* strains.

Keywords: Zataria multiflora, Staphylococcus aureus, Biofilm, Cinnamon.

1. **Received:** 2020/08/10 ; **Accepted:** 2020/10/07

**Copyright © the authors

بیولوژی کاربردی، دوره ۱۰، شماره ۳۹، پاییز ۱۳۹۹

مقاله پژوهشی

بررسی اثر اسانس آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) و دارچین (*Cinnamomum Verum*) بر تشکیل بیوفیلم سویه‌های بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس*[۱]

پریسا رحمتی | دانشجوی کارشناسی ارشد،گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران. microbiologist.dr.p.r@gmail.com

فاطمه نوربخش | دانشیار،گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران. **(نویسنده مسئول)**. niloofar_noorbakhsh@yahoo.com

عباس پازکی | استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران. drpazoki@yahoo.com

چکیده

هدف: *استافیلوکوکوس اورئوس* یک باکتری بیماری‌زای مهم انسانی بوده و یکی از پاتوژن‌هایی است که به‌طور شایع عفونت‌های در ارتباط با بیوفیلم را در کلینیک ایجاد می‌کند. مقاومت آنتی بیوتیکی در *استافیلوکوکوس اورئوس* انتشار جهانی پیدا کرده و یکی از مشکلات جدی جهت درمان بیماران است.

مواد و روش‌ها: پژوهش حاضر به بررسی اثر اسانس آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) و دارچین (*Cinnamomum Verum*) بر تشکیل بیوفیلم در سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* پرداخته است. در این مطالعه تعداد ۲۰ نمونه بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* از ادرار بیماران بستری در بخش مراقبت‌های ویژه بیمارستان طالقانی تهران جداسازی شد.آزمون میکرودایلوشن براث جهت تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) اسانس آویشن شیرازی و دارچین بر روی سویه‌های مورد مطالعه انجام شد. توانایی تشکیل بیوفیلم در سویه‌های جمع‌آوری شده به روش میکروتیترپلیت ارزیابی و اثر اسانس آویشن شیرازی و دارچین بر تشکیل بیوفیلم مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: در این مطالعه ۷۵٪ سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، بیوفیلم قوی و ۲۵٪ بیوفیلم متوسط تشکیل دادند. تیمار سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* با اسانس آویشن شیرازی در غلظت MIC موجب تشکیل ۴۰٪ بیوفیلم ضعیف شد و ۶۰٪ سویه‌ها، بیوفیلم تشکیل ندادند. تیمار سویه‌ها با اسانس دارچین در غلظت MIC به صورت ۲۵٪ بیوفیلم قوی و ۷۵٪ بیوفیلم متوسط مشاهده شد. مطالعه حاضر نشان‌دهنده تأثیر اسانس‌های آویشن شیرازی و دارچین در کاهش تشکیل بیوفیلم سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌باشد.

کلیدواژه‌ها: آویشن شیرازی، استافیلوکوکوس اورئوس، بیوفیلم، دارچین.

---

۱. **تاریخ دریافت:** ۱۳۹۹/۰۵/۲۰ ؛ **تاریخ پذیرش:** ۱۳۹۹/۰۷/۱۶

۱. مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس به عنوان یک باکتری گرم مثبت بیماری‌زا است که می‌تواند رنج وسیعی از عفونت‌های چرک‌زا، ذات‌الریه استافیلوکوکی، سندروم فلسی شونده پوست و سندروم شوک سمی را ایجاد کند (۱). یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زایی و مقاومت چند دارویی باکتری، تشکیل بیوفیلم است. گام اول عفونت استافیلوکوک دسترسی به سطح مواد مختلف شامل دستگاه‌های پزشکی و بافت میزبان می‌باشد. این واکنش‌ها به ترکیبی از عوامل خارج سلولی مانند چسبندگی و تشکیل بیوفیلم نسبت داده شده‌اند (۲). بیوفیلم باکتری‌ها شامل تجمعاتی از میکروارگانیسم‌ها، محصولات خارج سلولی و مواد موجود در فضای بین آنها است که به یک سطح متصل شده‌اند. ضخامت بیوفیلم می‌تواند از یک لایه تک سلولی تا یک جامعه، قابل توجه باشد که بستگی به محیط پلیمری چسبناک که در آن قرار گرفته است، دارد (۳). توسعه بیوفیلم *استافیلوکوکوس اورئوس* شامل پنج مرحله اتصال، تکثیر، خروج، بلوغ و پراکندگی است. *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌تواند بیوفیلم چند لایه در یک لایه گلیکوکالیکس تولید کند، گلیکوکالیکس از ۸۰% اسید تایکوئیک و پروتئین‌های استافیلوکوکی و میزبان تشکیل شده است (۴).

عفونت‌های حاصل از بیوفیلم *استافیلوکوکوس اورئوس* شدید است که نیازمند مداخلات بیشتر پزشکی و درمان طولانی مدت می‌باشد. از جمله بیماری‌های مرتبط با بیوفیلم *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌توان به استئومیلیت، عفونت دستگاه پزشکی، پریودنتیت و پری ایمپلنتیت، عفونت مزمن خون، رینوزیت مزمن، اندوکاردیت و عفونت چشمی اشاره کرد (۵).

بیوفیلم 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 مشکل است و پزشکان با معضلات زیادی در این زمینه روبه‌رو هستند. به دلیل خواص متمایز و نقش بیوفیلم‌ها در کاهش نفوذ دارو به داخل سلول باکتریایی، باکتری‌های مولد بیوفیلم مقاومت دارویی زیادی داشته و نیاز به استفاده از روش‌های درمانی متفاوتی برای درمان این نوع عفونت‌ها وجود دارد (۶،۷،۸). یکی از راه‌های مبارزه با بیوفیلم استفاده از داروهای گیاهی به جای آنتی‌بیوتیک است. اسانس‌های گیاهی، ترکیبات پیچیده‌ای از اجزای مختلف شیمیایی با مقادیر گوناگون می‌باشند. همچنین گیاهان دارویی عمدتاً قابل دسترس بوده و مقرون به صرفه می‌باشند (۵).

آویشن شیرازی با نام علمی *Zataria multiflora* گیاهی از خانواده نعناعیان است. اسانس

آویشن دارای خواص ضد باکتریایی و ضد قارچی، آنتی اکسیدانی و نگهدارنده طبیعی غذا می‌باشد (۹). اسانس آویشن می‌تواند از رشد *اشریشیاکلی انتروهموراژیک*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *انتروکوکوس* و همچنین *سودوموناس آئروژینوزا*، *اسینتوباکتر بومانی*، *آلکالیژنز و کریزئوباکتریوم منگوسپتیکوم* جلوگیری به عمل آورد. مطالعات نشان می‌دهد که عصاره الکلی آن می‌تواند مانع رشد سویه‌های *MRSA* (*استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین) شود (۱۰،۲). خواص ضد میکروبی اسانس کامل بیشتر از هر یک از ترکیبات آنها است که این نشان‌دهنده سینرژیستی ترکیبات موجود در اسانس با یکدیگر است. روغن قرمز آویشن از قرن ۱۶ تاکنون به عنوان میکروب‌کش مطرح بوده و خاصیت ضد میکروبی آن در اثر تیمول و کارواکرول می‌باشد (۱۱،۱۲).

دارچین با نام علمی *Cinnamomum Verum* درختچه‌ای از راسته لورالس[1]، تیره برگ بوها و از جنس دارچین‌ها[2] است (۱۳). دارچین به دلیل داشتن ترکیبات مؤثر سینامالدئید و اوژنول، خاصیت ضد میکروبی دارد (۱۴). اسانس دارچین دارای خاصیت ضدمیکروبی بر باکتری‌های عفونت‌زای دهان و دندان است (۱۵).

هدف مطالعه حاضر بررسی اثر اسانس آویشن شیرازی[3] و دارچین[4] بر تشکیل بیوفیلم در سویه‌های بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از نمونه ادرار می‌باشد.

۲. مواد و روش‌ها

۲-۱. انتخاب نمونه

در این مطالعه تعداد ۸۴ نمونه بالینی مشکوک به عفونت *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از ادرار بیماران بستری در بخش مراقبت‌های ویژه بیمارستان طالقانی تهران از تاریخ ۱۳۹۸/۶/۱ تا تاریخ ۱۳۹۸/۷/۲۰جداسازی گردید. نمونه‌ها روی محیط بلاد آگار کشت داده شد، سپس کشت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند، و از کشت‌های تازه جهت

1. Laurales
2. Cinnamomum
3. Zataria multiflora
4. Cinnamomum Verum

تست‌های افتراقی مانند رنگ‌آمیزی گرم، آزمایش کاتالاز، تست کوآگولاز و کشت در محیط مانیتول سالت آگار استفاده گردید. بعد از انجام تست‌های افتراقی، تعداد ۲۰ سویه جدا شد. نمونه استاندارد باکتریایی مورد مطالعه در این تحقیق *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) بود که به صورت لیوفیلیزه از کلکسیون میکروبی ایران در انستیتو پاستور خریداری شد.

۲-۲. بررسی میزان توانایی تشکیل بیوفیلم در سویه‌های جمع‌آوری شده به روش میکروتیتر پلیت

ابتدا محیط کشت Trypic Soy Broth (TSB) حاوی ۲% گلوکز تهیه و استریل گردید. برای تهیه سوسپانسیون باکتری، سویه‌های مورد مطالعه در مقداری از محیط TSB حاوی ۲% گلوکز به کدورت نیم مک فارلند رسانده شد. سپس در یک پلیت ۹۶ خانه به هر چاهک سوسپانسیون باکتری یاد شده اضافه شد. ۳ چاهک کنترل منفی که در آن باکتری اضافه نشده بود (عدم رشد باکتری در نتیجه عدم تشکیل بیوفیلم) و ۳ چاهک کنترل مثبت که حاوی باکتری بود (رشد باکتری و تشکیل بیوفیلم) در پلیت استفاده شد. سپس پلیت‌ها ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند.

۲-۳. روش رنگ‌آمیزی برای مطالعه بیوفیلم

ابتدا محیط کشت‌ها از داخل چاهک‌ها دور ریخته شد. چاهک‌ها ۱ الی ۲ بار با بافر PBS شستشو داده شد. بعد از شستشوی مرحله قبل و خالی کردن چاهک‌ها، به چاهک‌ها متانول مطلق افزوده و در دمای اتاق انکوبه گردید. سپس متانول دور ریخته شد و پلیت ثابت گذاشته شد تا الکل از آن حذف شود. به چاهک‌ها کریستال ویوله ۱% اضافه گردید و در دمای اتاق انکوبه شد. با آب مقطر چاهک‌ها شستشو داده شدند تا رنگ اضافی حذف گردد. در انتها چاهک‌ها خالی گردید. به هر یک از چاهک‌ها استیک اسید گلاسیال ۳۳% افزوده شد و بعداز گذشت ۲۰ دقیقه پلیت با دستگاه الایزا ریدر با طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد (۱۶).

برای بررسی نتایج از روش Optical density cut-off (ODc) استفاده گردید. محاسبات طبق فرمول زیر انجام گرفت:

ODc = میانگین OD چاهک‌های کنترل منفی + (انحراف معیار چاهک‌های کنترل منفی × 3)

بعد از محاسبه ODc یا کات اف، OD چاهک‌های مورد مطالعه طبق جدول زیر دسته‌بندی گردید.

جدول ۱- دسته‌بندی انواع بیوفیلم براساس روش میکروتیتر پلیت

قدرت تشکیل بیوفیلم	OD مشاهده شده
بیوفیلم قوی	OD>4×ODc
بیوفیلم متوسط	2×ODc<OD≤4×ODc
بیوفیلم ضعیف	ODc<OD≤2×ODc
بیوفیلم منفی	OD≤ODc

۲-٤. ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس آویشن شیرازی و دارچین

اسانس آویشن و دارچین مورد مطالعه از شرکت گل‌ها طب کاشان خریداری شد. آنالیز ترکیبات موجود در اسانس آویشن شیرازی و دارچین توسط شرکت گل‌ها طب کاشان انجام شد. بیشترین ترکیبات اسانس آویشن شیرازی را تیمول با ۳۳/۳۳% و کارواکرول با ۲۸/۶۹% و بیشترین ترکیبات اسانس دارچین را سینامالدئید با ۵۶/۳% تشکیل می‌دادند.

۲-۵. آزمون میکرودایلوشن براث برای تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC)

برای تعیین MIC از روش سریال دایلوشن به صورت سه تکرار در محیط کشت مولرهینتون براث (MHB) استفاده شد. بدین صورت که ابتدا به تمامی چاهک‌های مورد مطالعه ۱۰۰ میکرولیتر از محیط MHB افزوده شد. سپس به چاهک‌های ردیف اول ۱۰۰ میکرولیتر از اسانس آویشن شیرازی با غلظت ۱۲۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر اضافه شد و به روش سریال دایلویشن تا آخرین چاهک مورد مطالعه رقیق‌سازی انجام گرفت. در انتها۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری با غلظت 10^6 (۱/۱۰۰ کدورت نیم مک فارلند) به تمامی چاهک‌های مورد مطالعه افزوده شد. برای هر پلیت یک چاهک کنترل مثبت (محیط کشت و سوسپانسیون باکتری) و یک چاهک کنترل منفی (محیط کشت و اسانس) استفاده شد. پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت در گرم‌خانه تیمار شدند. تمامی این مراحل برای اسانس دارچین نیز انجام شد. نهایتاً، کدورت تمام چاهک‌ها با استفاده از دستگاه الیزا در طول موج ۶۲۰ نانومتر خوانش شدند (۱۶).

۲-٦. اندازه‌گیری تاثیر غلظت‌های MIC، ۲ برابر غلظت MIC و ٤ برابر غلظت MIC اسانس آویشن شیرازی و دارچین بر تولید بیوفیلم

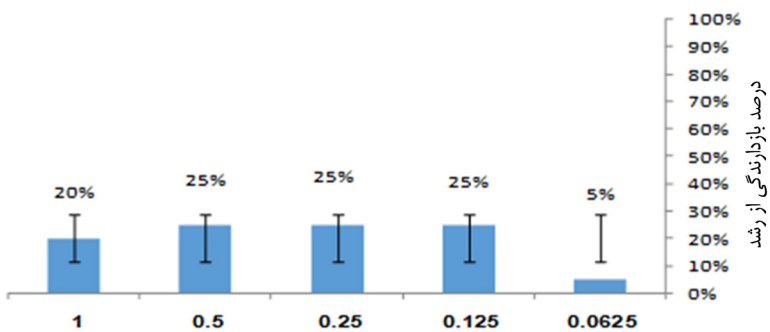
بعد از تهیه سوسپانسیون نیم مک فارلند از سویه‌های مورد مطالعه در محیط کشت TSB حاوی ۲% گلوکز در هنگام اضافه کردن سوسپانسیون باکتری به چاهک‌های مورد مطالعه برای

تشکیل بیوفیلم، غلظت MIC، ۲ برابر غلظت MIC و همچنین غلظت ۴ برابری MIC از اسانس‌ها نیز به چاهک‌ها برای هر سویه اضافه شد. در ادامه انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد. پس از گذشت این مدت رنگ‌آمیزی پلیت‌ها طبق رنگ‌آمیزی مرسوم که در بخش قبل ذکر شد، انجام گردید.

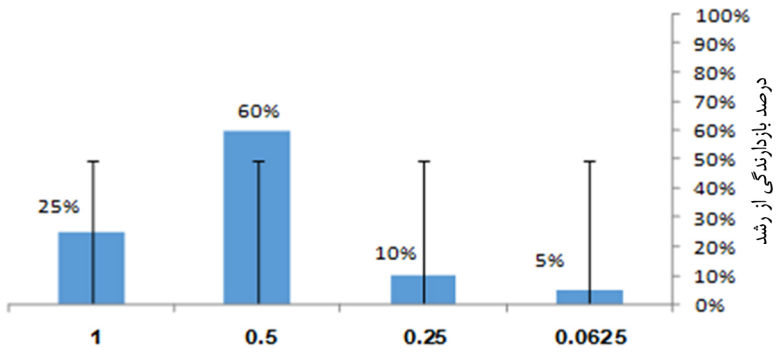
۳. نتایج

۳-۱. نتایج تعیین حداقل غلظت بازدارنده از رشد (MIC) اسانس آویشن شیرازی و اسانس دارچین

میزان بازدارندگی از رشد اسانس آویشن شیرازی و اسانس دارچین روی تمامی سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد مطالعه قرار گرفت. غلظت‌های ۰/۵، ۰/۲۵ و ۰/۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر از اسانس آویشن شیرازی با فراوانی ۲۵% بیشترین بازدارندگی از رشد و غلظت ۰/۰۶۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر با فراوانی ۵% کمترین بازدارندگی از رشد و غلظت ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر با فراوانی ۲۰% در میان سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مشاهده شد (نمودار۱). غلظت ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر از اسانس دارچین با فراوانی ۶۰% بیشترین بازدارندگی از رشد و غلظت ۰/۰۶۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر با فراوانی ۵% کمترین بازدارندگی از رشد و غلظت ۰/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر با فراوانی ۱۰% و غلظت ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر با فراوانی ۲۵% در میان سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مشاهده شد (نمودار۲).



نمودار۱ – غلظت‌های بازدارنده از رشد اسانس آویشن شیرازی



نمودار۲ – غلظت‌های بازدارنده از رشد اسانس دارچین

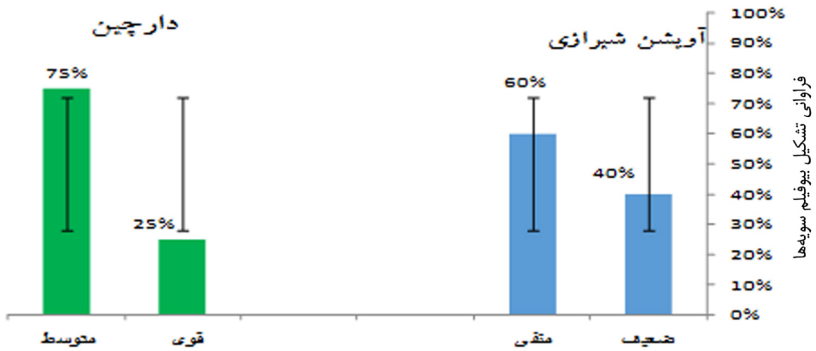
در مطالعه حاضر بین غلظت‌های مهارکننده از رشد اسانس آویشن شیرازی و اسانس دارچین ارتباط معناداری مشاهده نشد (Pvalue=0.1088).

۳-۲. بررسی تشکیل بیوفیلم با روش میکروتیتر پلیت

در مطالعه حاضر تمامی سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد بررسی، توانایی تشکیل بیوفیلم را نشان دادند. در این مطالعه ۷۵% سویه‌ها بیوفیلم قوی و ۲۵% سویه‌ها بیوفیلم متوسط تشکیل دادند.

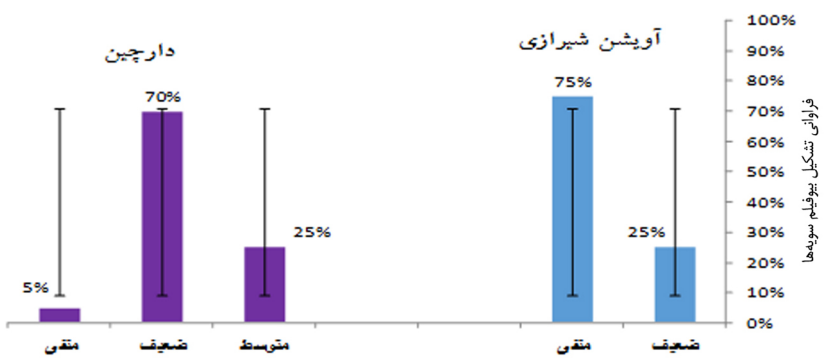
۳-۳. تاثیر غلظت‌های مختلفMIC اسانس‌های آویشن شیرازی و دارچین بر سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*

در مطالعه حاضر برای بررسی مهار تشکیل بیوفیلم در سویه‌های مورد مطالعه از غلظت‌های MIC، ۲ برابر غلظت MIC و ۴ برابر غلظت MIC اسانس‌های آویشن شیرازی و دارچین استفاده شد. میزان تشکیل بیوفیلم سویه‌های مورد مطالعه پس از تیمار با غلظت MIC اسانس آویشن شیرازی (۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به صورت بیوفیلم ضعیف با ۴۰% و بیوفیلم منفی با ۶۰% فراوانی، و پس از تیمار با غلظت MIC اسانس دارچین (۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به صورت، بیوفیلم قوی با ۲۵% و بیوفیلم متوسط با ۷۵% فراوانی مشاهده شد (نمودار۳).



نمودار ۳- میزان بیوفیلم تشکیل شده در سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* پس از تیمار با غلظت‌های MIC اسانس آویشن شیرازی و دارچین

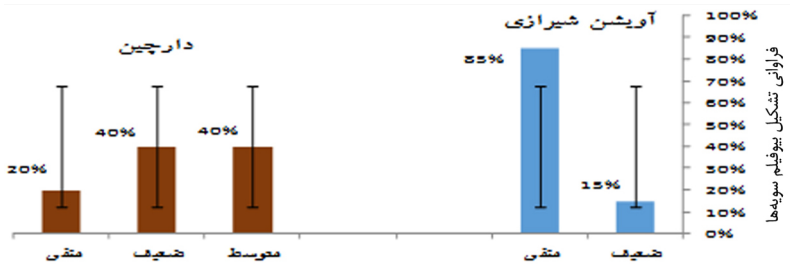
پس از تیمار با غلظت ۲ برابر MIC اسانس آویشن شیرازی (۱میکروگرم بر میلی‌لیتر) به صورت بیوفیلم ضعیف با ۲۵% و بیوفیلم منفی با ۷۵% فراوانی، و پس از تیمار با غلظت ۲ برابر MIC اسانس دارچین (۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به صورت بیوفیلم متوسط با ۲۵٪، بیوفیلم ضعیف با ۷۰% و بیوفیلم منفی با ۵% فراوانی مشاهده شد (نمودار۴).



نمودار ٤- میزان بیوفیلم تشکیل شده در سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* پس از تیمار با ۲ برابر غلظت MIC اسانس آویشن شیرازی و دارچین

پس از تیمار با غلظت ۴ برابر MIC اسانس آویشن شیرازی (۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به

صورت، بیوفیلم ضعیف با ۱۵% و بیوفیلم منفی با ۸۵% فراوانی، و پس از تیمار با غلظت ۴ برابر MIC اسانس دارچین (۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به صورت بیوفیلم متوسط با ۴۰%، بیوفیلم ضعیف با ۴۰% و بیوفیلم منفی با ۲۰% فراوانی مشاهده شد (نمودار۵).



نمودار ۵- میزان بیوفیلم تشکیل شده در سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* پس از تیمار با ٤ برابر غلظت MIC اسانس آویشن شیرازی و دارچین

٤. بحث

در سال ۱۹۴۰ پنی‌سیلین یکی از مؤثرترین داروهای ضد *استافیلوکوکوس اورئوس* بود تا اینکه از سال ۱۹۵۲ مقاومت به این آنتی بیوتیک ۷۰ تا ۸۰ درصد افزایش پیدا کرد (۱۷). مقاومت به پنی‌سیلین در سال ۱۹۶۱ به طور کامل گسترش پیدا کرد و تا جایی پیش رفت که *استافیلوکوکوس اورئوس* علاوه بر پنی‌سیلین به داروهای دیگری از جمله متی سیلین، نفی سیلین و اگزاسیلین و طیف گسترده‌ای از گروه‌های آنتی بیوتیکی وسیع‌الطیف مقاوم شد (۱۸). در این بین مقاومت به متی سیلین چالش جدیدی را به علم پزشکی معرفی کرد که ظهور سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین (MRSA) بود. با افزایش مقاومت نسبت به متی سیلین از ونکومایسین جهت درمان این باکتری استفاده شد (۱۹). اولین سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به ونکومایسین در سال ۲۰۰۲ از بیماری در کشور آمریکا جدا شد (۷). یکی از راه‌های مبارزه با بیوفیلم، استفاده از داروهای گیاهی به جای آنتی بیوتیک است. خواص ضد میکروبی اسانس‌های گیاهی شناخته شده می‌باشد. با توجه به این تأثیرات بیولوژیک، اسانس‌ها به عنوان جایگزین مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌ها با اهداف درمانی مورد توجه هستند (۲۰).

در این مطالعه اثر آنتی باکتریال اسانس‌های آویشن شیرازی و دارچین به روش میکرودایلوشن روی سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* انجام و نتایج به این صورت مشاهده شد: غلظت‌های

۰/۵، ۰/۲۵ و ۰/۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر از اسانس آویشن شیرازی با فراوانی ۲۵% بیشترین بازدارندگی از رشد را نشان داد. همچنین غلظت ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر از اسانس دارچین با فراوانی ۶۰% بیشترین بازدارندگی از رشد را نشان داد.

کیم[1] و همکاران (۲۰۰۴) در مطالعه‌ای اثر سینامالدئید دارچین را در غیرفعال شدن باکتری *اشریشیاکلی* مورد بررسی قرار داده و نشان دادند در غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، همه باکتری‌ها بعد از ۲ ساعت انکوباسیون از بین رفتند و بیان کردند که خاصیت ضد باکتریایی سینامالدئید بر روی باکتری از نوع باکتری سیدال بوده و در زیر میکروسکوپ الکترونی آسیب جدی به سطح باکتری دیده شده است. در مطالعه کیم از سینامالدئید که به عنوان یکی از ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس دارچین بود، استفاده شد که در غلظت بالایی باعث کاهش رشد باکتری گردید (۲۱)، درحالی‌که ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس با یکدیگر اثر هم‌افزایی دارند و استفاده از اسانس کامل دارچین در این مطالعه موجب توقف رشد استافیلوکوکوس اورئوس در غلظت پایین‌تر گردید.

اتصال سلول‌های میکروبی به سطوح و تجمع این سلول‌ها در تشکیل خوشه‌های سلولی چندلایه، مراحل اصلی عفونت است. *استافیلوکوکس اورئوس* قادر به تشکیل بیوفیلم و در نتیجه باعث عفونت و عوارض شدیدی می‌شود (۲۲). در مطالعه حاضر قدرت تشکیل بیوفیلم سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مشخص شد که ۷۵% بیوفیلم قوی و ۲۵% سویه‌ها بیوفیلم متوسط تشکیل دادند. بنابراین، تمامی سویه‌های مورد مطالعه توانایی تشکیل بیوفیلم را داشتند. در تحقیقی که ملو[2] و همکاران (۲۰۱۳) انجام دادند، ۹۸/۹% از ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد مطالعه با روش میکروتیتر پلیت تشکیل بیوفیلم دادند و تنها یک سویه قدرت تشکیل بیوفیلم را نداشت (۲۰).

در مطالعه‌ای گاد[3] و همکاران (۲۰۰۹) نشان دادند که از ۱۸ سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از سوندهای ادراری، ۱۵ سویه (۸۳%) تشکیل‌دهنده بیوفیلم بودند که از این میان۵۶% بیوفیلم قوی، ۲۷% بیوفیلم متوسط تشکیل دادند (۱۶). نوربخش و همکاران (۲۰۱۶) گزارش کردند که تشکیل بیوفیلم یکی از عوامل بیماری‌زایی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* محسوب می‌شود که به باکتری امکان اتصال به سطوح مختلف را می‌دهد. آنها نشان دادند که ۷۳/۵%

1. Kim
2. Melo
3. Gad

از سویه‌ها توانایی اتصال قوی، ۵/۳۳% اتصال متوسط و ۱۵/۴% توانایی اتصال ضعیف را در تولید بیوفیلم دارند (۲۳). در مطالعه حاضر برای بررسی مهار تشکیل بیوفیلم توسط سویه‌ها *استافیلوکوکوس اورئوس* از غلظت‌های MIC اسانس‌های آویشن شیرازی و دارچین استفاده شد. میزان تشکیل بیوفیلم سویه‌های مورد مطالعه پس از تیمار با غلظت MIC اسانس آویشن شیرازی (غلظت‌های ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به صورت بیوفیلم ضعیف با ۴۰% و بیوفیلم منفی با ۶۰% فراوانی، و اسانس دارچین (۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به صورت بیوفیلم قوی با ۲۵% و بیوفیلم متوسط با ۷۵% فراوانی مشاهده شد. پس از تیمار با ۲ برابر غلظت MIC اسانس آویشن شیرازی به صورت بیوفیلم ضعیف با ۲۵% و بیوفیلم منفی با ۷۵% فراوانی، و اسانس دارچین به صورت، بیوفیلم متوسط با ۲۵%، بیوفیلم ضعیف با ۷۰% و بیوفیلم منفی با ۵% فراوانی مشاهده شد. پس از تیمار با ۴ برابر غلظت MIC اسانس آویشن شیرازی به صورت بیوفیلم ضعیف با ۱۵% و بیوفیلم منفی با ۸۵% فراوانی، و اسانس دارچین به صورت، بیوفیلم متوسط با ۴۰%، بیوفیلم ضعیف با ۴۰% و بیوفیلم منفی با ۲۰% فراوانی مشاهده شد.

فیرمو[1] و همکاران (۲۰۱۸) نشان دادند غلظت MIC اسانس دارچین بر باکتری‌های *استرپتوکوکوس پایوژنز*، *سودوموناس ائروژینوزا* و *اشریشیاکلی* تا ۹۹% تشکیل بیوفیلم باکتری‌های مورد مطالعه را کاهش داده است. کاهش تشکیل بیوفیلم، به دلیل وجود ترکیبات سینامالدئید در اسانس دارچین است که بر روی ژن‌های دخیل در مسیر تشکیل بیوفیلم مؤثر است (۲۴). همچنین در مطالعه انجام شده توسط ایسید[2] و همکاران (۲۰۱۹) مشخص شد که اسانس دارچین در غلظت ۱/۲ MIC، بیوفیلم ایجاد شده توسط قارچ کاندیدا را به میزان ۸۰/۶% و در غلظت MIC به میزان ۸۵/۵۷% کاهش می‌دهد (۲۵). بودری[3] و همکاران (۲۰۱۵) اثر اسانس دارچین را بر تولید بیوفیلم در سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از شیر گاوهای مبتلا به ماستیت بررسی کردند و نشان دادند که اسانس دارچین و اجزای آن تشکیل بیوفیلم *استافیلوکوکوس اورئوس* را به طور قابل توجهی در پلی استایرن (۶۹/۶ تا ۷۴/۷ درصد) و در سطوح فولاد ضد زنگ (۴۴/۹ تا ۴۵/۳ درصد) کاهش داده است (۲۶).

1. Firmino
2. Essid
3. Budri

خدایی و همکاران (۱۳۹۷) بر روی ۱۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس مطالعه کردند، که ۶ سویه تولیدکننده بیوفیلم قوی و ۴ سویه تولیدکننده بیوفیلم متوسط بود. بعد از تیمار سویه‌ها با غلظت MIC، اسانس آویشن شیرازی بیوفیلم تمامی سویه‌ها منفی گزارش شد (۲۷). آذری و همکاران (۱۳۹۸) اثر اسانس آویشن شیرازی و رزماری بر باکتری *باسیلوس کوآگولانس* در سس کچاپ پروبیوتیک را بررسی کردند. در این تحقیق مشاهده شد اسانس آویشن شیرازی نسبت به اسانس رزماری بر روی باسیلوس کوآگولانس دارای اثر ضد میکروبی بیشتری می‌باشد (۲۸). نتیجه مشابهی در مطالعه آخوندزاده و همکاران (۱۳۹۳) در بررسی اثر ترکیبی لیزوزیم و اسانس آویشن شیرازی بر ویبریوپاراهمولیتکوس مشاهده شد (۲۹). الشونگات[1] و همکاران (۲۰۱۴) اثر اسانس آویشن وحشی در مهار سلول‌های پلانکتونیک و تشکیل بیوفیلم سویه‌های بالینی باکتری‌های مختلف از جمله *استافیلوکوکوس اورئوس* را مطالعه کردند و به این نتیجه رسیدند که این اسانس می‌تواند در مهار بیوفیلم این باکتری‌ها به طور معناداری موثر باشد. تیمول و کارواکرول از اجزای ضد میکروبی بسیار موثر در اسانس آویشن هستند. اثر ضد میکروبی آنها به دلیل نفوذپذیر نمودن غشای سلول توسط آنها است که می‌توانند با کاتیون‌های سطح غشا چلاته شده و فعالیت‌های حیاتی را مختل کنند (۳۰).

در مطالعه‌ای دیگر Ebani و همکاران (۲۰۱۸) در بررسی فعالیت ضد میکروبی پنج اسانس ریحان[2]، پونه کوهی[3]، مریم گلی[4]، آویشن[5] و رازیانه[6] در برابر باکتری‌ها و قارچ‌های مسئول عفونت ادراری (*انتروکوکوس* و *E.coli*) بیان کردند که با تأثیر MIC اسانس پنج گیاه بر *انتروکوکوس* و *E.coli* مشخص شد که هر پنج اسانس هیچ فعالیت ضد میکروبی بر جدایه‌های *انتروکوکوس* ندارند، در حالی که سبب مهار رشد در برخی از سویه‌های *E.coli* گردیدند. همچنین MIC برای پونه کوهی، مریم گلی و آویشن ۰/۱۴۶ و ۲/۳۴۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر و برای ریحان و رازیانه ۰/۲۸۵ و ۲/۲۸۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر بیان شد (۳۱).

---

1. Al-Shuneigat
2. Ocimum basilicum
3. Origanum vulgare L
4. Salvia Sclarea L
5. Thymus vulgaris
6. Illicium verum Hook.f

مان[1] و همکاران (۲۰۱۹) بر روی فعالیت ضد میکروبی شش اسانس گیاهی در مقابل گروه پاتوژن‌های انسانی مطالعه کردند. اسانس گیاهان کندر، مورد، آویشن، لیمو، پونه کوهی و اسطوخودوس در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس*، *انتروکوکوس فکالیس*، *اشریشیاکلی*، *کلبسیلا پنومونیه* و *سودوموناس آئروژینوزا* آزمایش شد. فقط اسانس‌های پونه کوهی و اسطوخودوس در برابر *کلبسیلا پنومونیه* دارای فعالیت ضد میکروبی بودند (۳۲). سولارت[2] و همکاران (۲۰۱۷) برروی ترکیب آنتی میکروب‌ها و اسانس گیاهی به عنوان جایگزینی برای کنترل سویه‌های مقاوم *سالمونلا انتریکا* در رابطه با بیماری‌های ناشی از غذا مطالعه کردند. در این مطالعه از اثر ترکیبی انروفلوکساسین (ENR)، سفتیوفور (CEF) و کوتریموکسازول (SXT) و اسانس گیاهان دارچین، میخک، پونه کوهی و آویشن در برابر چند گونه مقاوم به دارو *سالمونلا انتریکا* استفاده شد. نتایج نشان داد که حساسیت قابل توجهی در ترکیب آنتی میکروب‌ها و اسانس‌ها در همه گونه‌ها مشاهده شد و مؤثرترین ترکیب، ترکیب انروفلوکساسین و اسانس دارچین بود (۳۳).

کارکس[3] و همکاران (۲۰۱۹) بر روی تأثیر ضد بیوفیلم اسانس و عناصر اصلی منتخب گیاهی بر روی کشت‌های باکتریایی تک و پلی میکروبی مطالعه کردند. آنها تأثیر اسانس دارچین، پونه کوهی و آویشن و اجزای اصلی آنها به ترتیب ترانس سینامالدئید، ۴- ترپینول و تیمول را بر روی بیوفیلم‌های تک و پلی میکروبی از *اشرشیا کلی*، *لیستریا مونوسیتوژنز*، *سودوموناس پوتیدا* و *استافیلوکوکوس اورئوس* بررسی کردند. ترانس سینامالدئید ماده موثر دارچین، بیشترین اثر مهاری بر تشکیل بیوفیلم در سویه‌های میکروبی را نشان داد (۳۴).

کامیلا[4] و همکاران (۲۰۱۸) فعالیت ضد باکتریایی اسانس گیاهی مختلف را بر روی عوامل بیماری‌زای دستگاه تنفس ارزیابی کردند. در این مطالعه از اسانس میخک صد پر، دارچین، اکالیپتوس، آویشن، کاج اسکاتلندی، نعناع فلفلی و سنبل هندی در برابر پاتوژن‌های دستگاه تنفس مثل *استرپتوکوک پنومونیه*، *استرپتوکوک موتانس*، *استرپتوکوک پایوژنز*، *هموفیلوس آنفولانزا*، *هموفیلوس پارا آنفولانزا* و *موراکسلاکاتارالیس* استفاده شد. در بین اسانس‌ها، آویشن در برابر

1. Man
2. Solarte
3. Kerekes
4. Kamilla

استرپتوکوک موتانس و موراکسلاکاتارالیس مؤثرتر بود. اسانس دارچین مهار زیادی در برابر *استرپتوکوک پنومونیه*، *هموفیلوس آنفولا نزا* و *هموفیلوس پارا آنفولا نزا* نشان دادند، سایر اسانس‌ها فعالیت ضعیفی در برابر باکتری‌ها داشتند (۳۵). با مقایسه مطالعات متعدد مشخص شد که اسانس آویشن شیرازی و دارچین دارای اثر ضد میکروبی بر باکتری‌های مختلف هستند و همچنین قادرند از تشکیل بیوفیلم در باکتری ممانعت نمایند. یکی از ترکیبات مهم تشکیل‌دهنده اسانس آویشن شیرازی تیمول و کارواکرول است که با اثر بر غشاء سلولی باعث فعالیت ضد میکروبی می‌گردد. تشکیل بیوفیلم به فاکتورهای مختلفی بستگی دارد و در نتیجه به تحقیقات بیشتری برای بررسی اثر اسانس‌ها بر مراحل مختلف تشکیل بیوفیلم از نظر فنوتیپی و ژنوتیپی نیاز است.

۵. نتیجه‌گیری

در این مطالعه مشخص شد که با افزایش غلظت اسانس‌ها فنوتیپ بیوفیلم از قوی به ضعیف و منفی تغییر کرد که نشان‌دهنده این مطلب است که اسانس‌های آویشن و دارچین به طور مؤثری بر تشکیل بیوفیلم اثرگذار می‌باشند و اثر اسانس آویشن بر *استافیلوکوکوس اورئوس* مؤثرتر از اسانس دارچین است.

میزان تشکیل بیوفیلم سویه‌های مورد مطالعه پس از تیمار با غلظت MIC اسانس آویشن شیرازی (۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به صورت بیوفیلم ضعیف با ۴۰% و بیوفیلم منفی با ۶۰% فراوانی، و پس از تیمار با غلظت MIC اسانس دارچین (۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به صورت، بیوفیلم قوی با ۲۵% و بیوفیلم متوسط با ۷۵% فراوانی مشاهده شد. پس از تیمار با غلظت ۴ برابر MIC اسانس آویشن شیرازی (۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به صورت بیوفیلم ضعیف با ۱۵% و بیوفیلم منفی با ۸۵% فراوانی، و پس از تیمار با غلظت ۴ برابر MIC اسانس دارچین (۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به صورت بیوفیلم متوسط با ۴۰%، بیوفیلم ضعیف با ۴۰% و بیوفیلم منفی با ۲۰% فراوانی مشاهده شد.

٦. تقدیر و تشکر

مطالعه حاضر در آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه شهید بهشتی انجام شد. از کارشناس محترم بخش میکروبیولوژی آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه شهید بهشتی که در انجام این همراهی کردند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

1. Malekzadeh F. *Bacteriology*. 6th. Tehran: University of Tehran Press; 2015: 51-74. [In Persian]
2. Mahboubi M & Ghaian Bidgoli F. Anti Staphylococcus activity of Zataria mumultiflora essential oil and its synergy with vancomycin. *Phytomedicine*. 2012; 17: 548-50.
3. Hassan Nezhad M & et al. Comparison of biofilm formation with some phenotypic and genotypic indicators of Staphylococcus aureus. *Journal of Laboratory Sciences, Gorgan Paramedical School*. 2014; 8(3): 7-1. [In Persian]
4. Hammer KA, Carson CF & Riley TV. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*. 1999; 86: 985–990.
5. Lew DP & Waldvogel FA. Osteomyelitis. *The Lancet*. 2004; 79: 364-369.
6. Choopani E & et al. Frequency of Staphylococcus aureus strains isolated from wound infections and determination of drug allergy pattern in patients referred to Baqiyatallah Hospital, Tehran, 2006-2007. *Scientific Journal of Gorgan University of Medical Sciences*. 2011; 14(3): 135-140. [In Persian]
7. Shahina M & Khaksar R. Antimicrobial Effect and Methods of Determination of Minimum Inhibitory Concentration of Plant Essences on Pathogenic Bactria. *Iranian Journal of Nutrition Sciences and Food Technology*. 2012; 7(5): 949-955.
8. Tajik S & Najar Peerayeh S. Clinical significance and characteristics of acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus, including CA-MRSA. *Jornal of Laboratory and Diagnosis*. 2015; 7(27): 56-68. [In Persian]
9. James TK, Rahman A & Douglas JA. Control of weeds in five herb crops. *International Journal of Horticultural Science and Technology*. 1992; 62.
10. Kon KV & Rai MK. Plant essential oils and their constituents in coping with multidrug-resistant bacteria. *Expert review of anti-infective therapy*. 2012; 10(7): 775-790.
11. Aghel N, Moghimipour E & Ameri A. (2007). Characterization of an antidermatophyte cream from Zataria multiflora boiss. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2007; 3: 77–84.
12. Fu Y & et al. Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination . *Phytotherapy Research*. 2007; 21: 989–994.
13. Shen Q, Chen F & Luo J. Comparison studies on chemical constituents of essential oil from ramulus cinnamomi and cortex cinnamomi by GC-MS. *Journal of Chinese Medicinal Materials*. 2002; 25: 257–258.
14. Prasad, KN & et al. Flavonoid contents and antioxidant activities from cinnamun spesies. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 2009; 10: 627-32
15. Carroll KC & et al. *Jawetz Melnick & Adelbergs Medical Microbiology*. USA: Mc Graw Hill; 2016: 864.
16. Gad GFM. Detection of icaA, icaD genes and biofilm production by Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis isolated from urinary tract catheterized patients.

The Journal of Infection in Developing Countries. 2009; 3(05): 342-51
17. Agnoletti F, Mazzolini E, Bacchin C, Bano L, Berto G, Rigoli R. First reporting of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) ST398 in an industrial rabbit holding and in farm-related people. *Veterinary Microbiology*. 2014; 170(1–2): 172-7.
18. Taylor AR. Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Infections. *Primary Care: Clinics in Office Practice*. 2013; 40(3): 637-54.
19. Deresinski S. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: an evolutionary, epidemiologic, and therapeutic odyssey. *Clinical Infectious Diseases*. 2006; 40: 562-73.
20. Melo PdC & et al. (2013). Comparison of methods for the detection of biofilm formation by Staphylococcus aureus isolated from bovine subclinical mastitis. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2013; 44(1): 119-24.
21. Kim JM & et al. Antibacterial Activity of Carvacrol, Citral, and Geraniol against Salmonella typhimurium in Culture Medium and on Fish Cubes. *Food science*. 2004; 60(6): 1364-1368.
22. Donlan RM & Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms . *Clinical Microbiology Reviews*. 2002; 15: 167-93.
23. Nourbakhsh F & Momtaz H. Evaluation of Phenotypic and Genotypic Biofilm Formation in Staphylococcus aureus Isolates Isolated from Hospital Infections in Shahrekord, 2015. *Arak Medical University Journal*. 2016; 19(109): 69-79.
24. Firmino DF & et al. (2018). Antibacterial and antibiofilm activities of Cinnamomum sp. essential oil and cinnamaldehyde: Antimicrobial activities. *The Scientific World Journal*. 2018; Article ID 7405736. https://doi.org/10.1155/2018/7405736
25. Essid R & et al. Combined effect of Thymus capitatus and Cinnamomum verum essential oils with conventional drugs against Candida albicans biofilm formation and elucidation of the molecular mechanism of action. *Industrial Crops and Products*. 2019; 140: 111720.
26. Budri PE & et al. (2015). Effect of essential oils of Syzygium aromaticum and Cinnamomum zeylanicum and their major components on biofilm production in Staphylococcus aureus strains isolated from milk of cows with mastitis. *Journal of dairy science*. 2015; 98(9): 5899-5904.
27. Khodaie M, Mahdavi M & Honarmand Jahromi S. Evaluation of the effect of thyme essential oil against the biofilm of clinical strains of Staphylococcus aureus. *Biological Knowledge of Iran*. 2018; 13(1): 1-8. [In Persian]
28. Azarijuqan M, Sharifan A & Ahari H. Comparison of antimicrobial effect of thyme and rosemary essential oil on bacteria Bacillus coagulant in probiotic ketchup sauce. *Comparative Pathobiology*. 2019; 16(2): 2799-2806.
29. Akhond zadeh Basti A & et al. (2014). The combind effect of lysozyme and thyme essential oil on the bacterium Vibrio parahemoliticus. *Journal of Medicinal Plant*. 2014; 13(2): 27-34.
30. Al-Shuneigat J & et al. Effects of wild Thymus vulgaris essential oil on clinical isolates biofilm-forming bacteria. *Journal of Dental and Medical Sciences*, 2014; 13: 62-6.
31. Ebani VV, Nardoni S, Bertelloni F, Pistelli L & Mancianti F. Antimicrobial Activity of

Five Essential Oils against Bacteria and Fungi Responsible for Urinary Tract Infections. *Molecules*. 2018; 23(7): 1668.

32. Man A, Santacroce L, Jacob R, Mare A & Man L. Antimicrobial Activity of Six Essential Oils Against a Group of Human Pathogens: A Comparative Study, Pathogens. *MDPI (Multidisciplinary Digital Publishing Institute)*. 2019; 8(1).
33. Solarte AL, Astorga RJ & Aquiar F. (2017). Combination of Antimicrobials and Essential oils as an Alternative for the Control of Salmonella entrica Multiresistant Strains Related to Foodborne Disease. *Foodborne Pathogens and Disease*. 2017; 14(10): 558-563.
34. Kerekes EB & et al. Anti-Biofilm Effect of Selected Essential Oils and Main Components on Mono- and Polymicrobi Bacterial Culture. *Microorganisms*. 2019; 7(9).
35. Kamilla Ács & et al. Antibacterial activity evaluation of selected essential oils in liquid and vapor phase on respiratory tract pathogens. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2018; 18(1): 227.

استناد به این مقاله:

رحمتی، پریسا؛ نوربخش، فاطمه؛ پازکی، عباس (۱۳۹۹). بررسی اثر اسانس آویشن شیرازی (Zataria multiflora) و دارچین (Cinnamomum Verum) برتشکیل بیوفیلم سویه‌های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس. *بیولوژی کاربردی*، ۱۰(۳۹)، ص ۳۷-۵۴.