

## کاربرد هم‌زمان فسفومایسین و اسانس آویشن در کاهش میزان تولید بیوفیلیم سودوموناس آئروجینوزا

محمد مهدی یوسفی اصل<sup>۱</sup>، جاوید اقبال<sup>۲</sup>، حمیدرضا خلخالی<sup>۳</sup>، نیما حسینی جزنی<sup>۴</sup>

تاریخ دریافت 1394/09/01 تاریخ پذیرش 1394/11/10

### چکیده

**پیش‌زمینه و هدف:** سودوموناس آئروجینوزا باسیل گرم منفی مولد بیوفیلیم و فسفومایسین آنتی‌بیوتیکی وسیع‌الطیف و آویشن یکی از پر مصرف‌ترین گیاهان دارویی می‌باشند. هدف از انجام این مطالعه بررسی اثرات توأم فسفومایسین و اسانس آویشن بر میزان تولید بیوفیلیم سودوموناس آئروجینوزا PAOI می‌باشد. **مواد و روش کار:** حداقل غلظت مهارکننده و کشنده فسفومایسین و اسانس آویشن به ترتیب در دامنه غلظت 0/25 تا 128 میلی‌گرم در لیتر و 10 درصد\_0/078 درصد تعیین شد. تولید بیوفیلیم در غیاب و حضور غلظت‌های تحت کشنده از آنتی‌بیوتیک و یا اسانس و غلظت‌های توأم از هر دو اندازه‌گیری شد. آنالیز واریانس دوعاملی به‌منظور بررسی اثرات اصلی آویشن و آنتی‌بیوتیک و اثر متقابل آویشن و آنتی‌بیوتیک مورد استفاده قرار گرفت. **یافته‌ها:** حداقل غلظت مهارکننده و کشنده فسفومایسین 64 میکروگرم در میلی‌لیتر و حداقل غلظت کشنده اسانس آویشن 5 درصد بود. تولید بیوفیلیم در غیاب فسفومایسین و آویشن حداکثر و در حضور فسفومایسین و غلظت تحت کشنده 2/5 درصد اسانس آویشن کاهش یافت و کاهش بیشتری در حضور غلظت‌های توأم مشاهده شد. نتایج آنالیز آماری نشان داد که در تیمار سو به PAOI با تمامی دوزهای فسفومایسین از نظر میزان تولید بیوفیلیم با مورد بدون تیمار تفاوت معنی‌دار وجود دارد، ولی بین میزان کاهش تولید بیوفیلیم تحت تأثیر غلظت‌های مختلف آنتی‌بیوتیک با یکدیگر تفاوت معنی‌دار وجود نداشت (برای تفاوت مابین همه گروه‌ها  $p > 0.05$ ).

**بحث و نتیجه‌گیری:** کاربرد توأم اسانس آویشن و آنتی‌بیوتیک فسفومایسین به‌ویژه در غلظت‌های کم‌تر از آنتی‌بیوتیک فسفومایسین، روشی امیدبخش در کنترل و پیشگیری از تولید بیوفیلیم توسط سو به PAOI است.

**کلیدواژه‌ها:** سودوموناس آئروجینوزا، بیوفیلیم، فسفومایسین، آویشن

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و هفتم، شماره اول، ص 26-19، فروردین 1395

**آدرس مکاتبه:** بخش باکتری‌شناسی، گروه میکروبی‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، جاده نازلو، ارومیه. تلفن: 09143464234

Email: n\_jazani@yahoo.com

### مقدمه

رایج در درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری دارد. در سال‌های اخیر مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها در جدایه‌های بالینی سودوموناس آئروجینوزا رو به افزایش است و این روند رو به افزایش در مراکز مختلف درمانی در سرتاسر دنیا و هم‌چنین در ایران به اثبات رسیده است (1). حضور گلیکوکالیکس در این باکتری سبب می‌شود که اتصال باکتری به سلول میزبان و تشکیل میکرو کلنی در سطوح مختلف به سهولت انجام پذیرد، هم‌چنین سبب تشکیل بیوفیلیم می‌شود. بیوفیلیم باکتری‌ها شامل تجمعاتی از میکروارگانیسم‌ها، محصولات خارج سلولی و مواد موجود در فضای

سودوموناس آئروجینوزا باسیل گرم منفی هوازی اجباری و فلور طبیعی پوست و دستگاه گوارش به‌ویژه در افراد بستری یا مبتلا به نقص ایمنی بوده و در آب‌وخاک نیز یافت می‌شود. این باکتری بیماری‌زای فرصت‌طلب و یکی از مهم‌ترین عوامل ایجادکننده عفونت‌های بیمارستانی در طیف وسیعی از بیماران مبتلا به نقص سیستم ایمنی و دفاعی از قبیل افراد مبتلا به بدخیمی، سیستمیک فیبروز و سوختگی است. سودوموناس آئروجینوزا دارای عوامل متعدد بیماری‌زایی بوده و مقاومت زیادی نسبت به اکثر آنتی‌بیوتیک‌های

<sup>۱</sup> دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبی‌شناسی، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ارومیه، ارومیه

<sup>۲</sup> استادیار گروه پیراپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ارومیه، ارومیه

<sup>۳</sup> دانشیار آمار حیاتی، گروه آمار حیاتی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

<sup>۴</sup> استاد میکروبی‌شناسی، گروه میکروبی‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

کشت مولر هینتون برات (Merck) در هشت لوله آزمایش تهیه و با تعداد  $10^6 \times 1/5$  عدد باکتری تلقیح گردید. بعد از 24 ساعت انکوباسیون در 37 درجه سانتی‌گراد، لوله‌ها از نظر کدورت به‌طور چشمی مورد بررسی قرار گرفته و بالاترین رقتی که باعث مهار رشد باکتری شد (فقدان کدورت)، به‌عنوان حداقل غلظت بازدارنده (MIC) تعیین شد. از لوله‌های فاقد کدورت پنج میکرو لیتر روی محیط TSA (Merck) کشت داده شد. حداقل غلظتی که پس از گرم‌خانه گذاری شبانه مانع تشکیل کلنی باکتری در محیط کشت جامد می‌شد، به‌عنوان حداقل غلظت کشنده (MBC) در نظر گرفته شد (10).

اسانس آویشن از شرکت داروسازی باریج اسانس خریداری شد. برای تعیین حداقل غلظت مهارکننده رشد و حداقل غلظت کشنده اسانس آویشن از رقت‌های متوالی از غلظت 20 درصد حجمی اسانس آویشن در محیط کشت مولر هینتون برات حاوی 0/002 درصد توین 80 (به‌منظور افزایش حلالیت اسانس روغنی) (Merck) استفاده شد، بدین ترتیب که در هشت لوله غلظت‌های متوالی دو برابر از اسانس در دامنه غلظت 10 درصد\_0/078 درصد حجمی / حجمی در محیط کشت تهیه شد. هر یک از لوله‌ها با تعداد  $10^6 \times 1/5$  عدد باکتری تلقیح شد و در 37 درجه سانتی‌گراد به مدت 24 ساعت گرم‌خانه گذاری شد. چون افزودن اسانس خود باعث ایجاد کدورت در محیط کشت می‌شد، تعیین غلظت بازدارنده (MIC) اسانس با بررسی کدورت امکان‌پذیر نشد، بنابراین از کلیه لوله‌های تحت بررسی پنج میکرو لیتر روی محیط کشت جامد کشت داده شد و حداقل غلظت کشنده (MBC) اسانس آویشن به‌دست آمد (11) و (12).

به‌منظور بررسی اثرات غلظت تحت کشنده فسفومایسین و اسانس آویشن بر روی میزان تولید بیوفیلیم سودوموناس آئروجینوزا PAO1 از روش O'Toole با تغییرات جزئی استفاده شد و میزان تولید بیوفیلیم ابتدا در غیاب مواد ضد میکروبی و سپس در حضور غلظت‌های تحت کشنده از آنتی‌بیوتیک و یا اسانس اندازه‌گیری شده و مقادیر به‌دست‌آمده مورد مقایسه قرار گرفت. برای اندازه‌گیری میزان تولید بیوفیلیم، ابتدا سویه باکتریایی در محیط کشت TSB در دمای 37 درجه سانتی‌گراد به مدت یک شبانه‌روز کشت داده شد و سپس رقیق‌سازی صورت گرفته و 100 میکرو لیتر از کشت رقیق‌شده در هر یک از چاهک‌های میکروپلیت مورداستفاده کشت داده شد و در طول شب در دمای 37 درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه گذاری شد. پس از طی زمان انکوباسیون با وارونه نمودن و تکان دادن میکرو پلیت، سلول‌های پلانکتونی حذف‌شده و میکروپلیت در آب مقطر غوطه‌ور شده و به‌منظور حذف سلول‌های غیر متصل، ترکیبات محیط کشت و مایع اضافه، وارونه و تکان داده

بین آن‌ها است که به یک سطح متصل شده‌اند و به‌واسطه تولید بیوفیلیم، باکتری در برابر بیگانه‌خواری، عوامل ضد میکروبی، آنتی‌بیوتیک‌ها و آنتی‌بادی‌ها محافظت می‌شود (2,3). فسفومایسین از جمله آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف مهارکننده بیوسنتز پپتیدوگلیکان است که توسط گونه‌های استریتومایسین تولید می‌شود. این آنتی‌بیوتیک ساخت دیواره‌ی سلولی باکتری را به‌وسیله‌ی غیرفعال کردن آنزیم UDP-N-Acetyl glucosamine 3-enolpyruvyl transferase (MurA) در واقع باعث الحاق فسفوانول پیرووات (PEP) به گروه 3-هیدروکسیل از UDP-N-Acetyl glucosamine می‌شود که نهایتاً باعث تولید یکی از زیر واحدهای پپتیدوگلیکان تحت عنوان N-استیل مورامیک اسید می‌شود (4-6). مطالعات قبلی نقش مؤثر آنتی‌بیوتیک فسفومایسین را در همراهی با فلوروکینولون‌ها در کاهش میزان تولید بیوفیلیم سودوموناس آئروجینوزا نشان داده‌اند (7). آویشن گیاهی علفی با ساقه‌های کرکدار و سفید از خانواده نعناع (Lamiaceae) و یکی از پرمصرف‌ترین گیاهان دارویی ایران است که در طب سنتی ایران و اروپا مصرف دارویی دارد. اسانس آویشن حاوی ترکیبات ضد میکروبی بسیار مؤثر از قبیل کارواکرول (Carvacrol) ، پاراسیمن (P-cymene) ، تیمول (Thymol) ، لینالول (Linalool) و سینئول (Syneol) می‌باشد و از آن به‌عنوان داروی قوی ضد سرماخوردگی، ضد سرفه، ضد آکنه، خلط‌آور، کاهنده کلسترول و فشارخون، افزایش‌دهنده فعالیت سیستم ایمنی بدن و ضد اسپاسم استفاده می‌شود. هم‌چنین اثرات عصاره آبی و الکلی آویشن در کاهش میزان بیوفیلیم سودوموناس آئروجینوزا و استافیلوکوکوس ارئوس قبلاً نشان داده شده است (8) و (9). با توجه به این‌که یکی از عوامل مؤثر در بیماری‌زایی سودوموناس آئروجینوزا توانایی تشکیل بیوفیلیم توسط این باکتری است و با توجه به اثرات ضد بیوفیلیم آنتی‌بیوتیک فسفو مایسین و گیاه آویشن، این مطالعه برای اولین بار در دنیا به‌منظور بررسی اثرات فسفو مایسین و آویشن به‌تنهایی و در کاربرد توأم بر کاهش میزان تولید بیوفیلیم باکتری سودوموناس آئروجینوزا صورت گرفت تا نتایج حاصل از این مطالعه بتواند به طراحی درمان‌های مؤثرتر عفونت‌های ناشی از سودوموناس آئروجینوزا کمک نماید .

## مواد و روش کار

برای انجام این مطالعه از سویه استاندارد سودوموناس آئروجینوزا PAO1 استفاده شد. در ابتدا حداقل غلظت مهارکننده و حداقل غلظت کشنده فسفومایسین (Sigma) در مورد سویه مورد آزمایش تعیین شد. به‌طور خلاصه رقت‌های دو برابر از آنتی‌بیوتیک فسفومایسین در دامنه 0/25 تا 128 میلی‌گرم در لیتر در محیط

برای مقایسه میزان کاهش در تولید بیوفیلیم در شرایط مختلف آزمایش، نسبت جذب نوری بیوفیلیم تشکیل شده سویه تحت آزمایش انکوبه شده با اسانس، فسفومایسین یا هر دو ترکیب در مقایسه با جذب نوری بیوفیلیم تولیدی سودوموناس آئروجینوزای PAO1 بدون مواد ضد میکروبی محاسبه شد. جذب نوری بیوفیلیم سویه تحت آزمایش در غیاب مواد ضد میکروبی 100 درصد در نظر گرفته شد. نسبت جذب نوری (ODr) optical density ratio بر اساس تعیین نسبت جذب نوری در حضور ماده ضد میکروبی/ جذب نوری بدون حضور ماده ضد میکروبی (محاسبه شد. ODr پایین تر نشان دهنده اثر مهارتی بیشتر تیمار انجام شده بر روی تولید بیوفیلیم بود. کلیه آزمایشات بر طبق دستورالعمل موجود برای سنجش بیوفیلیم با هشت بار تکرار انجام شد (13، 15).

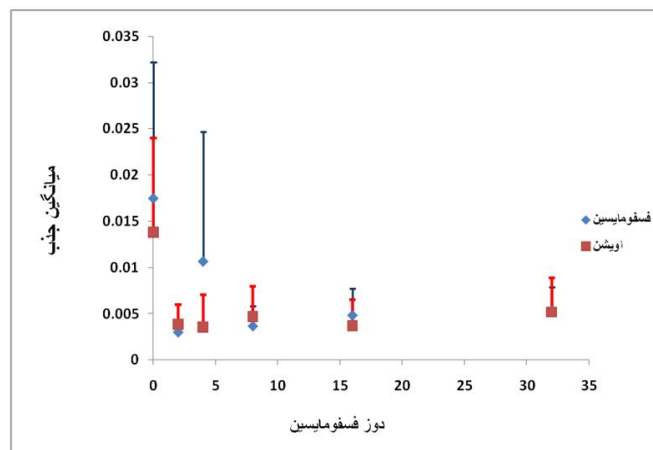
### یافته‌ها

نتایج تعیین حداقل غلظت مهارکننده و حداقل غلظت کشنده فسفومایسین و اسانس آویشن:

حداقل غلظت مهارکننده و کشنده فسفومایسین برای سودوموناس آئروجینوزای PAO1 64 میکروگرم در میلی لیتر و حداقل غلظت کشنده اسانس برای این سویه غلظت 5 درصد حجمی/حجمی از اسانس آویشن بود. به این ترتیب برای انجام مراحل بعدی غلظت‌های تحت کشنده (2، 4، 8، 16 و 32 میکروگرم/سی سی) از فسفومایسین و غلظت تحت کشنده 2/5 درصد از اسانس آویشن انتخاب شدند.

شد. به هریک از چاهک‌ها 125 میکرو لیتر از محلول کریستال ویوله 1 درصد به منظور رنگ آمیزی بیوفیلیم اضافه و انکوباسیون به مدت 10-15 دقیقه در دمای اتاق انجام شد. به منظور حذف رنگ اضافی پس از طی زمان ذکر شده، میکروپلیت مجدداً در آب مقطر غوطه‌ور شد و محتویات اضافی با وارونه کردن تخلیه شد. پس از خشک شدن میکروپلیت 125 میکرو لیتر از محلول اسید استیک (Merck) 30 درصد در آب به منظور حل کردن رنگ متصل به چاهک‌ها، به هر چاهک اضافه شد و پس از انکوباسیون و انتقال محتویات هر چاهک به میکروپلیت ته صاف، جذب محتویات هر چاهک در طول موج 550 نانومتر قرائت شد. از محلول اسید استیک 30 درصد به عنوان بلانک استفاده شد. طبق دستورالعمل‌های موجود برای سنجش میزان تولید بیوفیلیم، کلیه آزمایشات با هشت بار تکرار انجام شد (13).

به منظور بررسی اثرات ضد بیوفیلیم فسفومایسین و اسانس آویشن به تنهایی و با به صورت توأم، غلظت تحت کشنده 2/5 درصد از اسانس آویشن با غلظت‌های متعدد تحت کشنده (دو، چهار، هشت، 16 و 32 میکروگرم/ میلی لیتر) از فسفومایسین مورد استفاده قرار گرفت. به این منظور محیط کشت باکتریایی در مرحله تهیه رقت با استفاده از محیط کشت استریل حاوی فسفومایسین، آویشن یا هر دو هر بار به نحوی تهیه می‌شد که حاوی یکی از غلظت‌های ذکر شده از فسفومایسین، غلظت 2/5 درصد آویشن و یا یکی از غلظت‌های فسفومایسین همراه با غلظت 2/5 درصد از آویشن باشد. سپس روش سنجش تولید بیوفیلیم به طریق ذکر شده عیناً تکرار شد (14) و نتایج به دست آمده در هر مرحله ثبت شده و مورد مقایسه قرار گرفت.



**نمودار (۱):** میزان تولید بیوفیلیم (برحسب میزان جذب نوری در 550 نانومتر) در غیاب و حضور غلظت‌های تحت کشنده فسفومایسین و اسانس آویشن و غلظت‌های توأم از فسفومایسین و آویشن. (نقاط آبی رنگ میانگین جذب +SD را در حضور غلظت‌های مختلف {به ترتیب صفر، 2، 4، 8، 16 و 32 میلی گرم/ میلی لیتر} از فسفومایسین نشان می‌دهد. نقاط قرمز رنگ میانگین جذب +SD را در حضور غلظت‌های مختلف {به ترتیب صفر، 2، 4، 8، 16 و 32 میلی گرم/ میلی لیتر} از فسفومایسین در همراهی با غلظت 2/5 درصد از آویشن را نشان می‌دهد).

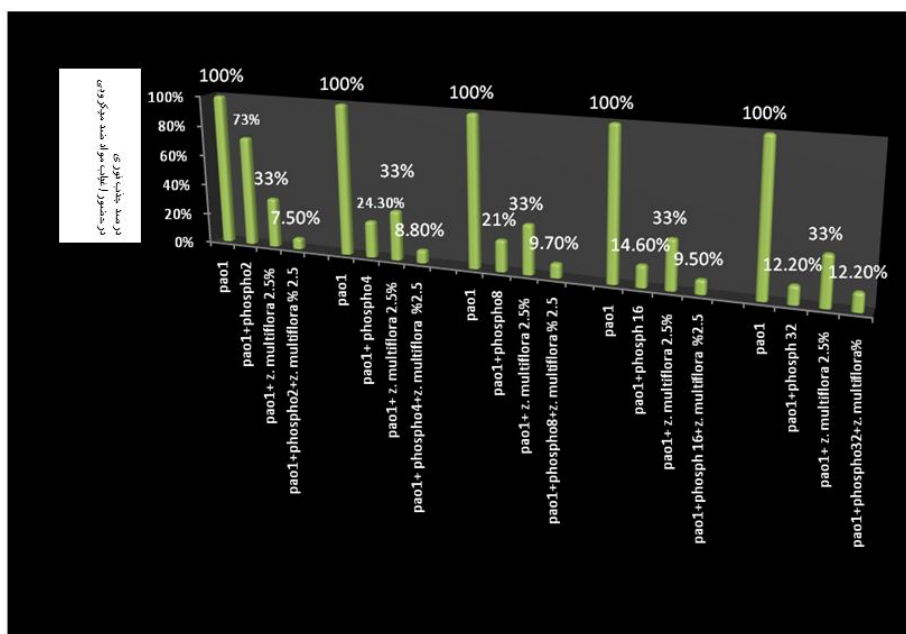
تحت کشنده فسفومايسين و غلظت تحت کشنده 2/5 درصد اسانس آویشن به‌طور قابل‌ملاحظه کاهش یافت و کاهش بیشتری در حضور غلظت‌های توأم فسفومايسين و آویشن مشاهده شد (نمودار 2).

محاسبه نسبت جذب نوری بیوفیلیم:

درصد کاهش در میزان جذب نوری (شدت تشکیل بیوفیلیم) بر اساس تعیین نسبت میزان جذب نوری در حضور ماده ضد میکروبی با غلظت مشخص / میزان جذب نوری بدون حضور ماده ضد میکروبی تعیین شد (نمودار 2).

تعیین میزان تولید بیوفیلیم سودوموناس آئروجینوزای PAO1 در غیاب و حضور فسفومايسين و اسانس آویشن:

میزان تولید بیوفیلیم سودوموناس آئروجینوزای PAO1 در غیاب و حضور غلظت‌های تحت کشنده فسفومايسين و اسانس آویشن و نیز حضور توأم غلظت‌های تحت کشنده از فسفومايسين و غلظت 2/5 درصد آویشن در نمودار 1 نشان داده شده است، همچنان که مشاهده می‌شود میزان تولید بیوفیلیم توسط این سویه در غیاب فسفومايسين و آویشن حداکثر بوده و در حضور غلظت‌های مختلف



**نمودار (2):** درصد کاهش در میزان تولید بیوفیلیم (شدت جذب نوری) پس از انجام تیمارهای مختلف در مقایسه با شرایط فقدان حضور ماده ضد میکروبی (درصد جذب در شرایط عدم حضور مواد ضد میکروبی 100 درصد در نظر گرفته شده است): PAO1. درصد جذب پس از تشکیل بیوفیلیم در چاهک‌ها توسط سویه تحت آزمایش در غیاب مواد بازدارنده (100 درصد). PAO1+ phospho4 ، PAO1+phospho2. بازدارنده 2، 4، 8، 16 و 32 میکروگرم/ میلی‌لیتر از آنتی‌بیوتیک فسفومايسين در مقایسه با شرایط فقدان حضور آن. 2/5 درصد PAO1+ Z. multiflora : درصد تولید بیوفیلیم (شدت جذب نوری) در حضور غلظت تحت کشنده 2/5 درصد حجمی/حجمی از اسانس آویشن در مقایسه با شرایط فقدان حضور آن.

در شدت جذب نوری در مقایسه با سایر تیمارها مشاهده می‌شود. نکته جالب در این یافته‌ها کاهش بیشتر در میزان تولید بیوفیلیم در کاربرد توأم آویشن و فسفومايسين در غلظت‌های پایین‌تر از فسفومايسين در مقایسه با غلظت‌های بالاتر از فسفومايسين است (phospho =Phosphomycin).

نتایج آنالیزهای آماری با استفاده از روش آنالیز واریانس دو عاملی به‌منظور بررسی اثرات اصلی آنتی‌بیوتیک و اثر متقابل آویشن و آنتی‌بیوتیک مورد استفاده قرار گرفت که در جدول 1 ذکر شده‌اند:

PAO1+ %2/5 ، PAO1+phospho2+Z. multiflora %2/5  
 PAO1+ phospho8 + Z. multiflora %2/5 ، phospho4 + Z. multiflora  
 multiflora %2/5 ، PAO1+ phospho16 + Z. multiflora  
 PAO1+ phospho32 + Z. multiflora %2/5 : درصد تولید بیوفیلیم (شدت جذب نوری) در مقایسه با شرایط فقدان حضور مواد ضد میکروبی به‌ترتیب در حضور غلظت تحت بازدارنده 2، 4، 8، 16 و 32 میکروگرم/ میلی‌لیتر از آنتی‌بیوتیک فسفومايسين در همراهی با غلظت 2/5 درصد حجمی/حجمی از اسانس آویشن. همچنانکه مشاهده می‌شود در غلظت‌های توأم کاهش بیشتری

جدول (1): آنالیز واریانس دوعاملی به منظور بررسی اثرات اصلی آویشن، اثرات اصلی آنتی‌بیوتیک و اثر متقابل آویشن و آنتی‌بیوتیک		
اثر اصلی	(P value) P	F (آماره آزمون با روش Repeated Measure (ANOVA))
اثر متقابل آنتی‌بیوتیک و آویشن معنی‌دار نیست	P=0.69	F(5, 60)=0.614
اثر اصلی آویشن معنی‌دار نیست	P=0.3	F(1,60)=1.09
اثر اصلی آنتی‌بیوتیک معنی‌دار می‌باشد	P=0.001	F(5, 60)=5.189

از سلول‌های راه‌های هوایی به دست آمده از بیماران مبتلا به سیستمیک فیبروز مورد بررسی قرار دادند. این محققین نشان دادند که کاربرد فسفومایسین به تنهایی باعث مهار تشکیل بیوفیلیم نشد، در حالی که توبرامایسین و ترکیب توبرامایسین / فسفومایسین باعث کاهش میزان تشکیل بیوفیلیم و یا تخریب آن شدند. همچنین نشان داده شد که تجویز دوزهای تحت MIC از مخلوط توبرامایسین / فسفومایسین و نیز دوزهای بالا از فسفومایسین باعث کاهش اثرات سمی ناشی از عفونت باکتریایی بر روی سلول‌های راه‌های هوایی می‌شود. این مطالعه نشان داد که کاربرد توأم فسفومایسین همراه با توبرامایسین، استفاده از دوزهای پایین‌تر توبرامایسین را برای درمان عفونت‌های ناشی از سودوموناس آئروجینوزای مولد بیوفیلیم ممکن می‌سازد که منجر به کاهش عوارض سوء ناشی از مصرف آمینوگلیکوزیدها می‌گردد (18).

در مطالعه دیگری که توسط Xu Z و همکاران در سال 2001 بر روی بررسی اثرات اریترومایسین و فسفومایسین در کاهش میزان تولید بیوفیلیم توسط سودوموناس آئروجینوزا انجام شد، نشان داده شد که دوزهای تحت MIC از آنتی‌بیوتیک‌های اریترومایسین و فسفومایسین (به عنوان آنتی‌بیوتیک‌های غیر کارا در درمان سودوموناس آئروجینوزا) قادر به مهار تولید بیوفیلیم سودوموناس آئروجینوزا در شرایط برون تنی می‌باشند (19). نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر با نتایج مطالعه Anderson و همکاران همسو نبود، که این اختلاف ممکن است به دلیل تفاوت در سویه‌های تحت بررسی، مدل آزمایش (کشت سلول در مقایسه با شرایط برون تنی) و یا نحوه سنجش میزان تولید بیوفیلیم باشد، از طرفی مطالعه حاضر یافته‌های مطالعه Xu Z و همکاران را تأیید می‌کند (نمودار 1).

در سال 1389 لیلا معین نجف آبادی و همکاران نشان دادند که غلظت‌های تحت MIC اسانس آویشن میزان تولید آئرنات، تشکیل بیوفیلیم، و اتصال در سودوموناس آئروجینوزا را کاهش می‌دهد و بنابراین آن‌ها نتیجه گرفتند که احتمالاً بتوان از این گیاهان در درمان عفونت‌های ناشی از سودوموناس آئروجینوزا استفاده کرد (20). یافته‌های مطالعه حاضر نیز نتایج به دست آمده توسط این محققین را تأیید می‌کند و نشان می‌دهد که غلظت تحت کشنده 2/5 درصد حجمی/حجمی از اسانس آویشن قادر به کاهش میزان

نتایج آنالیز آماری با روش مقایسه چندگانه نشان می‌دهد که در تیمار سویه سودوموناس آئروجینوزای PAO1 با تمامی دوزهای 2 تا 32 میلی‌گرم در میلی‌لیتر از فسفومایسین از نظر کاهش میزان تولید بیوفیلیم با مورد بدون تیمار تفاوت معنی‌دار وجود دارد ( $P=0.001$ )، ولی بین میزان کاهش تولید بیوفیلیم تحت تأثیر غلظت‌های مختلف تحت بازدارنده (2، 4، 8، 16 و 32 میکروگرم/ میلی‌لیتر) از فسفومایسین با یکدیگر تفاوت معنی‌دار وجود ندارد (برای تفاوت مابین همه گروه‌ها  $p>0.05$ ). (اعداد داخل پرانتز در ستون دوم درجه آزادی 1 و 2 برای انجام مقایسه‌های آماری درون گروهی و بین گروهی است).

### بحث و نتیجه‌گیری

بیوفیلیم باکتری‌ها شامل تجمعاتی از میکروارگانیسم‌ها، محصولات خارج سلولی و مواد موجود در فضای بین آن‌ها است که به یک سطح متصل شده‌اند. بیوفیلیم‌ها به دلیل ساختار خاص خود و وجود مواد پلیمری خارج سلولی باعث کاهش نفوذ عوامل ضد میکروبی می‌شوند و با استفاده از عوامل کنترل کننده رشد و تکثیر باکتری‌ها مانند حرارت، خشکی، پاک کننده‌ها و شوینده‌ها به سادگی از بین نمی‌روند و بر روی سطوح باقی می‌مانند. در حقیقت بیوفیلیم، گروهی از سلول‌های میکروبی است که با شبکه‌ای از کانال‌های داخلی در ماتریکس گلیکوپروتئینی و پلی ساکاریدی خارج سلولی در ارتباط هستند (16). در سال 2014 Mihailescu و همکاران فعالیت بالای فسفومایسین و ریفامپین را بر روی بیوفیلیم استافیلوکوکوس اورئوس‌های مقاوم به متی‌سیلین در شرایط *in vitro* و در مدل تجربی عفونت ناشی از جسم خارجی در بدن نشان دادند و این محققین نتیجه گرفتند که فسفومایسین در همراهی با ریفامپین در عفونت‌های ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس‌های مقاوم به متی‌سیلین در اجسام خارجی کاشته شده در بدن قابل کاربرد است، اما از نظر فعالیت آنتی بیوفیلیم آن نمی‌تواند جایگزین ریفامپین شود [17].

در سال 2013 Anderson و همکاران اثرات مهارکننده فسفومایسین، توبرامایسین و ترکیب فسفومایسین/ توبرامایسین (در نسبت وزنی 1/4) بر روی تشکیل بیوفیلیم بر روی کشت سلول حاصل

بوده و تجویز این دو ترکیب اگرچه از اثر جمعی برخوردار می‌باشند ولی رابطه هم‌افزایی بین دو ترکیب برقرار نمی‌باشد. در توضیح عدم وجود سینرژیسم بین فسفومایسین و آویشن باید گفت که اگرچه اثر ترکیب دو ماده در کاهش تولید بیوفیلم بیش از کاربرد هر یک از مواد به‌تنهایی بوده است ولیکن براساس محاسبات آماری انجام شده، اختلاف معنی‌داری بین مجموع اثرات هر ترکیب به‌تنهایی و کاربرد توأم آن‌ها وجود ندارد. هم‌چنین با توجه به اینکه در این مطالعه آزمایشات تنها بر روی سویه استاندارد PAOI از سودوموناس آئروجینوزا انجام گرفته است، لذا نتیجه‌گیری قطعی ممکن نبوده و پیشنهاد می‌شود که مطالعه مشابهی بر روی جدایه‌های متعدد بالینی از سودوموناس آئروجینوزا به‌منظور حصول نتایج قطعی انجام گیرد. در مجموع نتایج به‌دست‌آمده از پژوهش حاضر پیشنهاد می‌کند که علیرغم عدم وجود رابطه سینرژیستیک بین دو ترکیب، کاربرد توأم اسانس آویشن و آنتی‌بیوتیک فسفومایسین به‌ویژه در غلظت‌های کم‌تر از آنتی‌بیوتیک فسفومایسین، می‌تواند روشی امیدبخش در کنترل و پیشگیری از تولید بیوفیلم توسط سویه PAOI سودوموناس آئروجینوزا باشد.

تولید بیوفیلم سودوموناس آئروجینوزا PAOI می‌باشد (نمودار 1). هم‌چنین نتایج به‌دست‌آمده از مطالعه سپهری و همکاران نشان دهنده تأثیر بازدارنده غلظت‌های مختلف اسانس آویشن بر روی تشکیل بیوفیلم جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس بود (8). مطالعه حاضر برای اولین بار نقش توأم فسفومایسین و اسانس آویشن را در کاهش میزان تولید بیوفیلم توسط سودوموناس آئروجینوزای PAOI مورد مطالعه قرار داد. نکته جالب در این مطالعه آن است که هم‌چنان که در نمودار 2 مشاهده می‌شود، در تیمار سویه با غلظت‌های مختلف تحت بازدارنده از فسفومایسین، با افزایش غلظت فسفومایسین میزان تولید بیوفیلم کاهش می‌یابد، در حالی که در شرایط تحت تیمارهای توأم، با کاهش غلظت فسفومایسین، تأثیر ضد بیوفیلم بیشتری مشاهده می‌شود (نمودار 2). در نهایت می‌توان نتیجه گرفت که تجویز دوزهای مختلف تحت MIC از آنتی‌بیوتیک فسفومایسین باعث بیشترین میزان کاهش در تولید بیوفیلم در مقایسه با سایر تیمارها شده است. میزان تولید بیوفیلم در حضور غلظت تحت‌کشنده 2/5 درصد از آویشن نیز به‌طور قابل توجهی کاهش یافته است. کاربرد توأم آویشن و فسفومایسین نیز اگرچه مفید

## References:

- Rybtke M, Hultqvist LD, Givskov M, Tolker-Nielsen T. Pseudomonas aeruginosa biofilm infections: community structure, antimicrobial tolerance and immune response. *J Mol Biol* 2015; pii: S0022-2836(15)00481-7.
- Salimi H, Yakhchali B, Owlia P, Rastegar Lari A. Molecular epidemiology and drug susceptibility of Pseudomonas aeruginosa strains isolated from burn patients. *Lab medicine* 2010; 41(9): 540-4.
- Mirzaee M, Najar-Peerayeh Sh, Behmanesh M, Forouzandeh Moghadam M, Ghasemian A. Biofilm Formation and Presence of ica Genes in Staphylococcus aureus Isolated from Intensive Care Unit. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2014; 24 (115) : 43-51.
- El Zoeiby A, Sanschagrín F, Levesque R.C. Structure and function of the Mur enzymes: development of novel inhibitors. *Molecular Microbiol* 2003; 47(1): 1-12.
- Kahan FM, Kahan JS, Cassidy PJ, Kropp H. The mechanism of action of fosfomycin (phosphonomycin). *Annals of the New York Academy of Sciences* 1974; 235(1): 364-86.
- Barbosa MD, Yang G, Fang J, Kurilla MG, Pompliano DL. Development of a whole-cell assay for peptidoglycan biosynthesis inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46(4): 943-6.
- Mikuniya T, Kato Y, Ida T, Maebashi K, Monden K, Kariyama R, Kumon H. Treatment of Pseudomonas aeruginosa biofilms with a combination of fluoroquinolones and fosfomycin in a rat urinary tract infection model. *J Infect Chemother* 2007; 13(5):285-90.
- Sepehri Z, Nasiri A, Hesarakhi M, Javadian F, Kiani Z, Foladvand Z. Evaluation of the effect of antimicrobial activity of ethanol extract of Myrtus communis, Zataria multiflora Boiss and Allium sativum on biofilm formation by Staphylococcus aureus. *J Sabzevar Univ Med Sci* 2015; 21 (6): 1019-27.
- Sepahi R, Sepahi E, Shahriar Ahmadi F, Tarighi S, Bagheri A. The effect of some herbal plants on biofilm formation in Pseudomonas aeruginosa. *The*

- 2<sup>nd</sup> National Congress of Veterinary Laboratory Sciences 12-13 Dec 2012, Semnan: Semnan University- Iran; 2012. (Persian)
10. Andrews JM. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J Antimicrob Chemother* 2001;48 (suppl 1): 5-16.
  11. Soltan Dallal MM, Bayat M, Yazdi MH, Agha Amiri S, Ghorbanzadeh Meshkani M, Abedi Mohtasab T, Shojaee Sadi B. Evaluation of the antimicrobial effects of Thyme essential oil on antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from food. *Sci J Kurdistan Univ Med Sci* 2012; 17(2): 21-9.
  12. Hojjati M. Evaluation of the antimicrobial effects of essential oils from plants of Lamiaceae family on *Staphylococcus aureus*. Bojnourd: National conference on natural products and medicinal plants; 2012
  13. O'Toole GA. Microtiter dish biofilm formation assay. *J Vis Exp* 2011; (47). pii: 2437.
  14. Balaji K, Thenmozhi R, Karutha Pandian S. Effect of sub inhibitory concentrations of fluoroquinolones on biofilm production by clinical isolates of *Streptococcus pyogenes*. *Indian J Med Res* 2013; 137: 963-71.
  15. Wu W, Chen C, Chuang Y, Chiu Y, Hsu H, Ko W, et al. Efficacy of combination oral antimicrobial agents against biofilm-embedded methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Microbiol Immunol Infect* 2013; 46(2):89-95.
  16. Masák J, Čejková A, Schreiberová O, Rezanka T. *Pseudomonas* biofilms: possibilities of their control. *FEMS Microbiol Ecol* 2014; 89(1):1-14
  17. Mihailescu R, Furustrand Tafi U, Corvec S, Oliva A, Betrisey B, Borens O, et al. High activity of fosfomycin and rifampin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm in vitro and in an experimental foreign-body infection model. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58(5): 2547-53.
  18. Anderson GG, Kenney TF, Macleod DL, Henig NR, O'Toole GA. Eradication of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms on cultured airway cells by a fosfomycin/tobramycin antibiotic combination. *Pathog Dis* 2013; 67(1):39-45.
  19. Xu Z, Liu F, Wang X. Effects of erythromycin and fosfomycin on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm in vitro. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi* 2001; 24(6):342-4.
  20. Moein Najafabadi L, Owlia P, Mousavi Nadoushan S, Rasooli I, Saderi H, Sefidkon F, et al. The effects of sub-inhibitory concentrations of some essential oils on adherence, motility, alginate production and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Iran J Med Aromatic Plants* 2010; 26(1): 74-82. (Persian)

## APPLICATION OF THE COMBINED EFFECT OF PHOSPHOMYCIN AND ZATARIA MULTIFLORA ESSENTIAL OIL ON REDUCTION OF BIOFILM AMOUNTS PRODUCED BY P.AERUGINOSA PAO1

Mohammad mehdi Yousefzadeh<sup>1</sup>, Javid Eghbal<sup>2</sup>, Hamid Reza Khalkhali<sup>3</sup>, Nima Hosseini Jazani<sup>4</sup>

Received: 22 Nov, 2015; Accepted: 30 Jan, 2016

### Abstract:

**Background & Aims:** *Pseudomonas aeruginosa* is a gram-negative bacterium which is capable of producing biofilm, phosphomycin is one of the broad-spectrum antibiotics and *Zataria multiflora* is among the most widely used medicinal plants. The aim of this study was to evaluate the combined effects of Phosphomycin and *Z.multiflora* essential oil against biofilm formation by *P. aeruginosa* PAO1.

**Materials & Methods:** Minimum inhibitory concentration (MIC) and Minimum bactericidal concentration (MBC) of phosphomycin and *Z.multiflora* essential oil were determined in the concentration range of 0.25- 128 mg and 0.078%- 10% v/v, respectively. The biofilm formation amounts were measured in the absence of antimicrobials and then in the presence of sub-lethal concentrations of them alone or in combination. Two-factor analysis of variance was used to assess the main effects of *Z.multiflora* essential oil, antibiotic and the interaction between *Z.multiflora* essential oil and phosphomycin.

**Results:** Minimum inhibitory and bactericidal concentrations of phosphomycin were 64 mg/mL and minimum bactericidal concentration of the essential oil was 5%. The amount of biofilm formation in the absence of phosphomycin and *Z.multiflora* essential oil was the most, but in the presence of phosphomycin and sub-lethal concentration (2.5% V/V) of *Z.multiflora* essential oil was significantly reduced. More reduction was observed in the presence of the both compounds. Statistical analysis showed that there was a significant difference in biofilm formation in the presence of all phosphomycin doses compared with its absence; however, there was no significant difference between the amounts of biofilm formation in the presence of different concentrations of antibiotic (the difference between all groups,  $p > 0.05$ ).

**Conclusion:** Combined use of *Z.multiflora* essential oil and phosphomycin, especially in low concentrations of phosphomycin, is a promising way to control and prevent biofilm formation by of *P. aeruginosa* PAO1.

**Keywords:** *P. aeruginosa*, Phosphomycin, Biofilm, *Z.multiflora*

**Address:** Urmia, Urmia University of Medical Sciences

**Tel:** (+98) 9143464234

**Email:** n\_jazani@yahoo.com

SOURCE: URMIA MED J 2016; 27(1): 26 ISSN: 1027-3727

<sup>1</sup> M.Sc. Student of Microbiology, Department of Biology, Urmia Branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran

<sup>2</sup> Assistant professor, Department of Paramedical Sciences, Urmia Branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran

<sup>3</sup> Associate Professor of Biostatistics, Department of Biostatistics, Faculty of Medicine, Urmia, University of Medical Sciences

<sup>4</sup> Professor of Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran (Corresponding Author)