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

محمدمهدی یوسفی اصل[۱]، جاوید اقبال[۲]، حمیدرضا خلخالی[۳]، نیما حسینی جزنی[۴]

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

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: سودوموناس آئروجینوزا باسیل گرم منفی مولد بیوفیلم و فسفومایسین آنتی‌بیوتیکی وسیع‌الطیف و آویشن یکی از پرمصرف‌ترین گیاهان دارویی می‌باشند. هدف از انجام این مطالعه بررسی اثرات توأم فسفو مایسین و اسانس آویشن بر میزان تولید بیوفیلم سودوموناس آئروجینوزا PAO1 می‌باشد.

مواد و روش کار: حداقل غلظت مهارکننده و کشنده فسفومایسین و اسانس آویشن به ترتیب در دامنه غلظت 0/25 تا128 میلی‌گرم در لیتر و 10درصد_0/078درصد تعیین شد. تولید بیوفیلم در غیاب و حضور غلظت‌های تحت کشنده از آنتی‌بیوتیک و یا اسانس و غلظت‌های توأم از هردو اندازه‌گیری شد. آنالیز واریانس دوعاملی به‌منظور بررسی اثرات اصلی آویشن و آنتی‌بیوتیک و اثر متقابل آویشن و آنتی‌بیوتیک مورداستفاده قرار گرفت.

یافته‌ها: حداقل غلظت مهارکننده و کشنده فسفومایسین 64 میکروگرم در میلی‌لیتر و حداقل غلظت کشنده اسانس آویشن 5درصد بود. تولید بیوفیلم در غیاب فسفومایسین و آویشن حداکثر و در حضور فسفومایسین و غلظت تحت کشنده 2/5درصد اسانس آویشن کاهش یافت و کاهش بیشتری در حضور غلظت‌های توأم مشاهده شد. نتایج آنالیز آماری نشان داد که در تیمار سویه PAO1 با تمامی دوزهای فسفومایسن ازنظر میزان تولید بیوفیلم با مورد بدون تیمار تفاوت معنی‌دار وجود دارد، ولی بین میزان کاهش تولید بیوفیلم 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 فسفومایسن به‌ویژه در غلظت‌های کم‌تر از آنتی‌بیوتیک فسفومایسین، روشی امیدبخش در کنترل و پیشگیری از تولید بیوفیلم توسط سویه PAO1 است.

کلیدواژه‌ها: سودوموناس آئروجینوزا، بیوفیلم، فسفومایسین، آویشن

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

آدرس مکاتبه: بخش باکتری‌شناسی، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، جاده نازلو، ارومیه. تلفن: 09143464234
Email: n_jazani@yahoo.com

مقدمه

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، سیستیک فیبروز و سوختگی است. سودوموناس آئروجینوزا دارای عوامل متعدد بیماری‌زایی بوده و مقاومت زیادی نسبت به اکثر آنتی‌بیوتیک‌های 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 بیوفیلم می‌شود. بیوفیلم باکتری‌ها شامل تجمعاتی از میکروارگانیسم‌ها، محصولات خارج سلولی و مواد موجود در فضای

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب شناسی، گروه زیست شناسی ، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ارومیه ، ارومیه
[۲] استادیار گروه پیراپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ارومیه، ارومیه
[۳] دانشیار آمار حیاتی، گروه آمار حیاتی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه
[۴] استاد میکروب شناسی، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

بین آن‌ها است که به یک سطح متصل شده‌اند و به‌واسطه تولید بیوفیلم، باکتری در برابر بیگانه‌خواری، عوامل ضد میکروبی، آنتی‌بیوتیک‌ها و آنتی‌بادی‌ها محافظت می‌شود (2،3). فسفومایسین ازجمله آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف مهارکننده بیوسنتز پپتیدوگلیکان است که توسط گونه‌های استرپتومایسس تولید می‌شود. این آنتی‌بیوتیک ساخت دیواره‌ی سلولی باکتری را به‌وسیله‌ی غیرفعال کردن آنزیم UDP-N-Acetyl glucosamine three enolypyrovyl transferase که همچنین Mur A نامیده می‌شود، مهار می‌کند. آنزیم (MurA) درواقع 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 بیوفیلم سودوموناس آئروجینوزا نشان داده‌اند(7). آویشن گیاهی علفی با ساقه‌های کرکدار و سفید از خانواده نعناع (Lamiasceae) 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، افزاینده فعالیت سیستم ایمنی بدن و ضد اسپاسم استفاده می‌شود. هم‌چنین اثرات عصاره آبی و الکلی آویشن در کاهش میزان بیوفیلم 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 بیوفیلم توسط این باکتری است و با توجه به اثرات ضد بیوفیلم 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 بیوفیلم 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 کشت مولرهینتون براث (Merck) در هشت لوله‌آزمایش تهیه و با تعداد 10^6 × 1/5 عدد باکتری تلقیح گردید. بعد از 24 ساعت انکوباسیون در 37 درجه سانتی‌گراد، لوله‌ها ازنظر کدورت به‌طور چشمی موردبررسی قرارگرفته 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 20درصد حجمی اسانس آویشن در محیط کشت مولر هینتون براث 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 10درصد_0/078درصد حجمی/ حجمی در محیط کشت تهیه شد. هر یک از لوله‌ها با تعداد 10^6 × 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(11و 12).

به‌منظور بررسی اثرات غلظت تحت کشنده فسفومایسین و اسانس آویشن بر روی میزان تولید بیوفیلم سودوموناس آئروجینوزای PAO1 از روش O'Toole با تغییرات جزئی استفاده شد و میزان تولید بیوفیلم 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 بیوفیلم، ابتدا سویه باکتریایی در محیط کشت TSB در دمای 37 درجه سانتی‌گراد به مدت یک شبانه‌روز کشت داده شد و سپس رقیق‌سازی صورت گرفته و100 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

شد. به هریک از چاهک‌ها 125 میکرو لیتر از محلول کریستال ویوله 1درصد به‌منظور رنگ‌آمیزی بیوفیلم اضافه و انکوباسیون به مدت 10-15 دقیقه در دمای اتاق انجام شد. به‌منظور حذف رنگ اضافی پس از طی زمان ذکرشده، 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) 30درصد در آب به‌منظور 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 طول‌موج 550 نانومتر قرائت شد. از محلول اسید استیک 30درصد به‌عنوان بلانک استفاده شد. طبق دستورالعمل‌های موجود برای سنجش میزان تولید بیوفیلم، کلیه آزمایشات با هشت بار تکرار انجام شد(13).

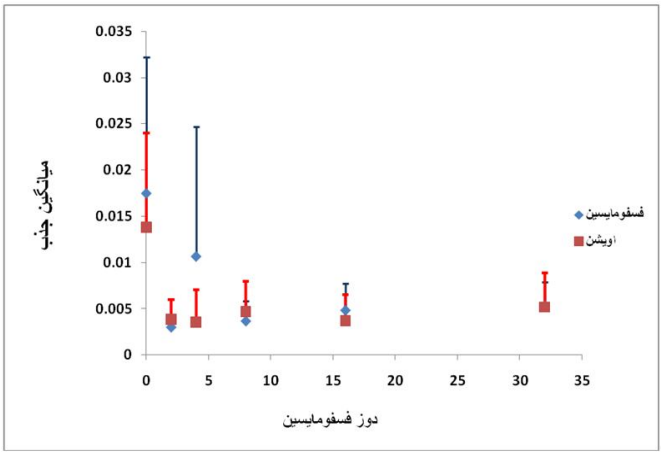
به‌منظور بررسی اثرات ضد بیوفیلم فسفومایسین و اسانس آویشن به‌تنهایی و یا به‌صورت توأم، غلظت تحت کشنده 2/5درصد از اسانس آویشن با غلظت‌های متعدد تحت کشنده (دو، چهار، هشت، 16 و 32 میکروگرم/ میلی‌لیتر) از فسفومایسین مورداستفاده قرار گرفت. به این منظور محیط کشت باکتریایی در مرحله تهیه رقت با استفاده از محیط کشت استریل حاوی فسفومایسین، آویشن یا هردو هر بار به نحوی تهیه می‌شد که حاوی یکی از غلظت‌های ذکرشده از فسفومایسین، غلظت 2/5درصد آویشن و یا یکی از غلظت‌های فسفومایسین همراه با غلظت 2/5درصد از آویشن باشد. سپس روش سنجش تولید بیوفیلم به طریق ذکرشده عیناً تکرار شد(14) و نتایج به‌دست‌آمده در هر مرحله ثبت‌شده و مورد مقایسه قرار گرفت.

برای مقایسه میزان کاهش در تولید بیوفیلم در شرایط مختلف آزمایش، نسبت جذب نوری بیوفیلم تشکیل‌شده سویه تحت آزمایش انکوبه شده با اسانس، فسفومایسین یا هر دو ترکیب در مقایسه با جذب نوری بیوفیلم تولیدی سودوموناس آئروجینوزای PAO1 بدون مواد ضد میکروبی محاسبه شد. جذب نوری بیوفیلم سویه تحت آزمایش در غیاب مواد ضد میکروبی 100درصد در نظر گرفته شد. نسبت جذب نوری optical density ratio(ODr) بر اساس تعیین نسبت جذب نوری در حضور ماده ضد میکروبی/ جذب نوری بدون حضور ماده ضد میکروبی)محاسبه شد. ODr پایین‌تر نشان‌دهنده اثر مهاری بیشتر تیمار انجام‌شده بر روی تولید بیوفیلم بود. کلیه آزمایشات بر طبق دستورالعمل موجود برای سنجش بیوفیلم 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 میلی‌لیتر و حداقل غلظت کشنده اسانس برای این سویه غلظت 5درصد حجمی/ حجمی از اسانس آویشن بود. به‌این‌ترتیب برای انجام مراحل بعدی غلظت‌های تحت کشنده (2، 4، 8، 16 و 32 میکروگرم/ سی‌سی) از فسفومایسین و غلظت تحت کشنده 2/5درصد از اسانس آویشن انتخاب شدند.



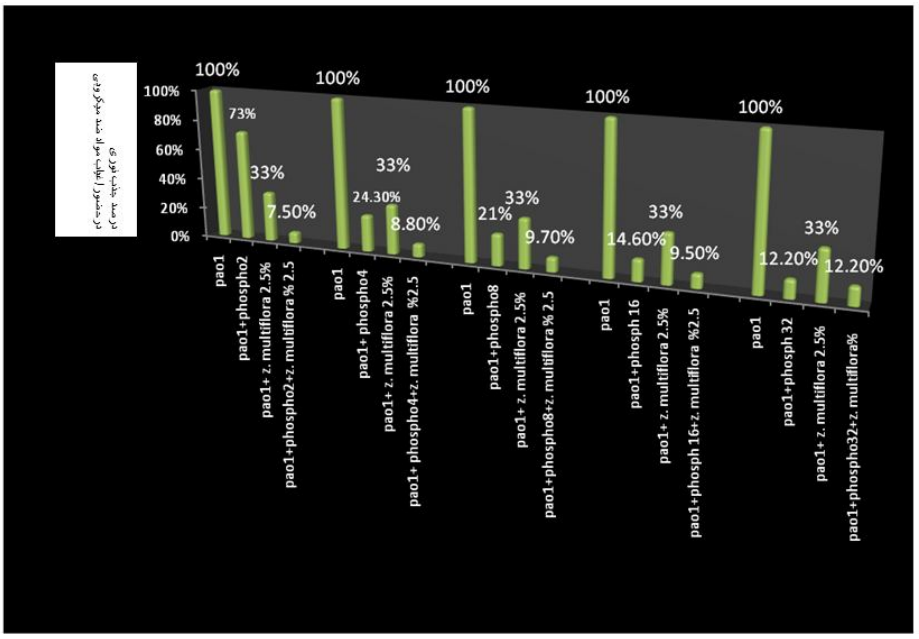
نمودار (۱): میزان تولید بیوفیلم(برحسب میزان جذب نوری در 550 نانومتر) در غیاب و حضور غلظت‌های تحت کشنده فسفومایسین و اسانس آویشن و غلظت‌های توأم از فسفومایسین و آویشن. (نقاط آبی‌رنگ میانگین جذب +SD را در حضور غلظت‌های مختلف {به‌ترتیب صفر، 2، 4، 8، 16 و32 میلی‌گرم/ میلی‌لیتر} ازفسفومایسین نشان می‌دهد. نقاط قرمزرنگ میانگین جذب +SD را در حضور غلظت‌های مختلف {به‌ترتیب صفر، 2، 4، 8، 16 و32 میلی‌گرم/ میلی‌لیتر} از فسفومایسین در همراهی با غلظت 2/5درصد از آویشن را نشان می‌دهد).

تعیین میزان تولید بیوفیلم سودوموناس آئروجینوزای PAO1 در غیاب و حضور فسفومایسین و اسانس آویشن:

میزان تولید بیوفیلم سودوموناس آئروجینوزای PAO1 در غیاب و حضور غلظت‌های تحت کشنده فسفومایسین و اسانس آویشن و نیز حضور توأم غلظت‌های تحت کشنده از فسفومایسین و غلظت 2/5درصد آویشن در نمودار 1 نشان داده شده است، همچنان که مشاهده می‌شود میزان تولید بیوفیلم توسط این سویه در غیاب فسفومایسین و آویشن حداکثر بوده و در حضور غلظت‌های مختلف تحت کشنده فسفومایسین و غلظت تحت کشنده 2/5درصد اسانس آویشن به‌طور قابل‌ملاحظه کاهش یافت و کاهش بیشتری در حضور غلظت‌های توأم فسفومایسن و آویشن مشاهده شد (نمودار 2).

محاسبه نسبت جذب نوری بیوفیلم:

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



نمودار (۲): درصد کاهش در میزان تولید بیوفیلم(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 100درصد در نظر گرفته شده است): PAO1: درصد جذب پس از تشکیل بیوفیلم در چاهک‌ها توسط سویه تحت آزمایش در غیاب مواد بازدارنده (100درصد) . PAO1+phospho2 ، PAO1+ phospho4، PAO1+phospho8، PAO1+phospho 16، PAO1+phospho 32 درصد تولید بیوفیلم(شدت جذب نوری) به‌ترتیب در حضور غلظت تحت بازدارنده 2، 4، 8، 16 و 32 میکروگرم/ میلی‌لیتر از آنتی‌بیوتیک فسفومایسین در مقایسه با شرایط فقدان حضور آن. 2/5درصد .PAO1+ Z. multiflora : درصد تولید بیوفیلم (شدت جذب نوری) در حضور غلظت تحت کشنده 2/5درصد حجمی/حجمی از اسانس آویشن در مقایسه با شرایط فقدان حضور آن.

PAO1+ %2/5 ،PAO1+phospho2+Z. multiflora %2/5 PAO1+ phospho8 + Z. %2/5 ،phospho4 + Z. multiflora multiflora، %2/5 ،PAO1+ phospho16 + Z. multiflora %2/5 :PAO1+ phospho32 + Z. multiflora درصد تولید بیوفیلم (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 فسفومایسین در همراهی با غلظت 2/5درصد حجمی/حجمی از اسانس آویشن. همچنانکه مشاهده می‌شود در غلظت‌های توأم کاهش بیشتری درشدت جذب نوری در مقایسه با سایر تیمارها مشاهده می‌شود. نکته جالب دراین یافته‌ها کاهش بیشتر درمیزان تولید بیوفیلم در کاربرد توأم آویشن و فسفومایسن در غلظت‌های پایین‌تر از فسفومایسین در مقایسه با غلظت‌های بالاتر از فسفومایسین است (phospho =Phosphomycin).

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

جدول (۱): آنالیز واریانس دوعاملی به‌منظور بررسی اثرات اصلی آویشن ، اثرات اصلی آنتی‌بیوتیک و اثر متقابل آویشن و آنتی‌بیوتیک

اثر اصلی	P(P value) ملاک آزمون برای قضاوت آماری	F(آماره آزمون F با روش Repeated Measure (ANOVA)
اثر متقابل آنتی‌بیوتیک وآویشن معنی‌دار نیست	P=0.69	F(5, 60)=0.614
اثراصلی آویشن معنی‌دار نیست	P=0.3	F(1,60)=1.09
اثر اصلی آنتی‌بیوتیک معنی‌دار می‌باشد	P=0.001	F(5, 60)=5.189

نتایج آنالیز آماری با روش مقایسه چندگانه نشان می‌دهد که در تیمار سویه سودوموناس آئروجینوزای PAO1 باتمامی دوزهای 2 تا 32 میلی‌گرم در میلی‌لیتر از فسفومایسین ازنظر کاهش میزان تولید بیوفیلم با مورد بدون تیمار تفاوت معنی‌دار وجود دارد(P=0.001)، ولی بین میزان کاهش تولید بیوفیلم 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 و2 برای انجام مقایسه‌های آماری درون گروهی و بین گروهی است).

بحث و نتیجه‌گیری

بیوفیلم باکتری‌ها شامل تجمعاتی از میکروارگانیسم‌ها، محصولات خارج سلولی و مواد موجود درفضای بین آن‌ها است که به یک سطح متصل شده‌اند. بیوفیلم ها به‌دلیل ساختار خاص خود و وجود مواد پلیمری خارج سلولی باعث کاهش نفوذ عوامل ضد میکروبی می‌شوند و با استفاده از عوامل کنترل کننده رشد وتکثیر باکتری‌ها مانند حرارت ، خشکی، پاک کننده‌ها و شوینده‌ها به سادگی از بین نمی‌روند و بر روی سطوح باقی می‌مانند. در حقیقت بیوفیلم، 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 Mihailescu 2014 و همکاران فعالیت بالای فسفومایسین و ریفامپین را برروی بیوفیلم استافیلوکوکوس اورئوس‌های مقاوم به متی‌سیلین در شرایط in vitro ودر 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 ازنظر فعالیت آنتی بیوفیلم آن نمی‌تواند جایگزین ریفامپین شود[17].

در سال Anderson 2013 وهمکاران اثرات مهارکننده فسفومایسین، توبرامایسین وترکیب فسفومایسین/ توبرامایسین(در نسبت وزنی 1/4) برروی تشکیل بیوفیلم برروی کشت سلول حاصل از سلول‌های راه‌های هوایی به‌دست آمده از بیماران مبتلا به سیستیک فیبروز مورد بررسی قرار دادند. این محققین نشان دادند که کاربرد فسفومایسین به‌تنهایی باعث مهار تشکیل بیوفیلم نشد، در حالی که توبرامایسین وترکیب توبرامایسین / فسفومایسین باعث کاهش میزان تشکیل بیوفیلم ویا تخریب آن شدند. هم‌چنین نشان داده شد که تجویز دوزهای تحت MIC از مخلوط توبرامایسین/ فسفومایسین ونیز دوزهای بالا از فسفومایسین باعث کاهش اثرات سمی ناشی از عفونت باکتریایی برروی 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 بیوفیلم 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 برروی بررسی اثرات اریترومایسین وفسفومایسین در کاهش میزان تولید بیوفیلم توسط سودوموناس آئروجینوزا انجام شد، نشان داده شد که دوز های تحت MIC از آنتی‌بیوتیک‌های اریترومایسین و فسفومایسین (به‌عنوان آنتی‌بیوتیک‌های غیر کارا در درمان سودوموناس آئروجینوزا) قادر به مهار تولید بیوفیلم سودوموناس آئروجینوزا در شرایط برون تنی می‌باشند(19). نتایج به‌دست‌آمده در مطالعه حاضر با نتایج مطالعه Anderson و همکاران همسو نبود، که این اختلاف ممکن است به‌دلیل تفاوت در سویه‌های تحت بررسی، مدل آزمایش(کشت سلول در مقایسه با شرایط برون تنی) ویا نحوه سنجش میزان تولید بیوفیلم باشد، از طرفی مطالعه حاضر یافته‌های مطالعه Xu Z وهمکاران را تائید می‌کند(نمودار 1).

در سال 1389 لیلا معین نجف آبادی وهمکاران نشان دادند که غلظت‌های تحت MICاسانس آویشن میزان تولید آلژینات، تشکیل بیوفیلم، 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 به‌دست‌آمده توسط این محققین را تائید می‌کند ونشان می‌دهد که غلظت تحت کشنده 2/5درصد حجمی/حجمی از اسانس آویشن قادر به کاهش میزان

تولید بیوفیلم سودوموناس آئروجینوزا PAO1 می‌باشد(نمودار 1). همچنین نتایج به‌دست‌آمده از مطالعه سپهری وهمکاران نشان دهنده تأثیر بازدارنده غلظت‌های مختلف اسانس آویشن برروی 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 PAO1 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 درشرایط 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 تحت کشنده 2/5 درصد از آویشن نیز به‌طور قابل توجهی کاهش یافته است. کاربرد توأم آویشن وفسفومایسن نیز اگرچه مفید بوده وتجویز این دو ترکیب اگرچه از اثر جمعی برخوردار می‌باشند ولی رابطه هم افزایی 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 هریک از مواد به‌تنهایی بوده است ولیکن براساس محاسبات آماری انجام شده، اختلاف معنی‌داری بین مجموع اثرات هرترکیب به‌تنهایی و کاربرد توأم آن‌ها وجود ندارد. هم‌چنین با توجه به اینکه در این مطالعه آزمایشات تنها برروی سویه استاندارد PAO1 از سودوموناس آئروجینوزا انجام گرفته است، لذا نتیجه‌گیری قطعی ممکن نبوده وپیشنهاد 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 فسفومایسن به‌ویژه در غلظت‌های کم‌تر از آنتی‌بیوتیک فسفومایسین، می‌تواند روشی امیدبخش در کنترل و پیشگیری از تولید بیوفیلم توسط سویه PAO1 سودوموناس آئروجینوزا باشد.

References:

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. El Zoeiby A, Sanschagrin F. Levesque R.C, Structure and function of the Mur enzymes: development of novel inhibitors. Molecular Microbiol 2003; 47(1): 1-12.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. Sepehri Z, Nasiri A, Hesaraki 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.
9. Sepahi R, Sepahi E, Shahriar Ahmadi F, Tarighi S, Bagheri A. The effect of some herbal plants on biofilm formation in Pseudomonas aeruginosa. The

2nd 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. Bojnoord: 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 Tafin 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)

Original Article

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

Mohammad mehdi Yousefee asl[1], Javid Eghbal[2], Hamid Reza Khalkhali[3], Nima Hosseini Jazani[4]

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

[1] M.Sc. Student of Microbiology, Department of Biology, Urmia Branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran
[2] Assistant professor, Department of Paramedical Sciences, Urmia Branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran
[3]Associate Professor of Biostatistics, Department of Biostatistics, Faculty of Medicine, Urmia, University of Medical Sciences
[4] Professor of Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran (Corresponding Author)