DOI: 10.22055/ivj.2024.411258.2604

بررسی تأثیر اسانس گیاه *لعل کوهستان* بر بیوفیلم *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از مواد غذایی و انسان

مهشاد جاویدمقدم[۱]، سیاوش مکتبی[۲*]، مهدی زارعی[۲] و پژمان محمودی‌کوهی[۳]

[۱] دانش‌آموخته دکترای بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
[۲] استاد گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
[۳] دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده پیرادامپزشکی، دانشگاه بوعلی سینا همدان، همدان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۵/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۲/۱۱

چکیده

استافیلوکوکوس اورئوس یک باکتری گرم مثبت و پاتوژن است که موجب مشکلات متعددی در حوزه پزشکی، دامپزشکی و صنایع غذایی می‌شود. اکثر میکروارگانیسم‌ها از جمله *استافیلوکوکوس اورئوس* قادر به اتصال و تشکیل بیوفیلم روی سطوح مختلف هستند. تشکیل بیوفیلم، موجب افزایش مقاومت باکتری‌ها به تنش‌های فیزیکی و شیمیایی محیطی، ترکیبات ضد میکروب و ضدعفونی‌کننده‌ها می‌گردد. در این مطالعه تأثیر اسانس گیاه لعل کوهستان بر بیوفیلم *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از انسان و مواد غذایی (لبنیات) با استفاده از روش میکروتیتر پلیت، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده در این مطالعه نشان داد که اسانس لعل کوهستان دارای اثرات قابل توجهی بر بیوفیلم باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* بوده ولی تفاوت تأثیر اسانس بر بیوفیلم تشکیل شده توسط باکتری‌های جدا شده از انسان و مواد غذایی معنی‌دار نیست. با توجه به تأثیر اسانس لعل کوهستان بر بیوفیلم *استافیلوکوکوس اورئوس*، این اسانس می‌تواند به عنوان یک عامل مؤثر در کنترل بیوفیلم‌های باکتریایی مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: اسانس، *استافیلوکوکوس اورئوس*، بیوفیلم، لعل کوهستان

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس یک باکتری گرم مثبت با قدرت رقابتی ضعیف است و حضور این باکتری در مواد غذایی که فلور میکروبی طبیعی آن‌ها از بین رفته یا محدود شده مانند گوشت پخته و نمک‌سود شده، با بیش‌ترین خطر همراه است. *استافیلوکوکوس اورئوس* یک ارگانیسم بسیار سازگار در محیط زیست است که در طیف وسیعی از محیط‌ها قادر به زنده ماندن است (Rod et al, 2007).

اکثر میکروارگانیسم‌ها در محیط‌های طبیعی تشکیل بیوفیلم می‌دهند. بیوفیلم را می‌توان اجتماعی از باکتری‌ها نامید که به سطح متصل شدند و در ماتریکسی از ترکیبات پلیمری خارج سلولی محصور شده‌اند و تغییرات فنوتیپی را با توجه به بیان ژن، تولید پروتئین و رشد نشان می‌دهد (Abdallah et al, 2014). بیوفیلم‌ها در طیف گسترده‌ای از سطوح مختلف تشکیل می‌شوند. ضخامت بیوفیلم‌ها از یک

* نویسنده مسئول: سیاوش مکتبی، استاد گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
E-mail: s.maktabi@scu.ac.ir

© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

لایه سلول تا اجتماع ضخیمی از سلول‌ها، حاوی چندین لایه ترکیبات خارج سلولی متغیر است. باکتری‌های محصورشده در بیوفیلم در مقایسه با سلول‌های پلانکتونی مقاومت بیشتری نسبت به تنش‌های فیزیکی و شیمیایی محیطی، ترکیبات ضد میکروب و ضدعفونی‌کننده‌ها دارند (Fratamico et al, 2009; Srey et al, 2013). تشکیل بیوفیلم در صنایع مختلف از جمله حفاری نفت، تولید کاغذ، فراوری مواد غذایی، زمینه‌های مرتبط با سلامت مانند پزشکی و دندانپزشکی، موجب پیامدهای قابل توجهی می‌شود. بیوفیلم‌های تشکیل شده در محیط‌های فراوری مواد غذایی از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند زیرا این بیوفیلم‌ها به عنوان یک منبع بالقوه آلودگی‌های میکروبی عمل می‌کنند که ممکن است منجر به فساد مواد غذایی یا انتقال بیماری‌ها شوند (Van Houdt and Michiels, 2010).

در سال‌های اخیر، با توجه به اهمیت بیوفیلم *استافیلوکوکوس اورئوس* و خسارات ناشی از آن، محققان، تحقیقات زیادی در زمینه بررسی نحوه تشکیل بیوفیلم‌ها و مکانیسم‌های مهار آن انجام داده‌اند (Almeida et al, 2022; Ersanli et al, 2023; Lin et al, 2023).

در سال‌های اخیر علاقه به محصولات ضدمیکروب طبیعی افزایش یافته است. مهمترین ترکیبات مورد مطالعه در این زمینه ترکیبات منشا گرفته از گیاهان می‌باشد که خواص ضدمیکروبی و پزشکی زیادی نشان می‌دهند (Nikravan et al, 2021). اسانس‌ها ترکیبات فرار با خاصیت ضدمیکروبی هستند که محیط نامناسب برای رشد بسیاری از باکتری‌ها و قارچ‌ها فراهم می‌کنند. اسانس‌ها ترکیباتی پیچیده و ناهمگن، از موادی با منشاء بیوسنتزی متفاوت از جمله ترپن‌ها، ترپنوئیدها و ترکیبات آروماتیک و یا آلیفاتیک می‌باشند (Bazargani and Rohloff, 2016). اثر ضدبیوفیلمی اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی در مطالعات مختلف و در مقابله با باکتری‌هایی از جمله *اشرشیاکلی* (Agrawal, 2011)، *لیستریامونوسیتوژنز* (Sandasi et al, 2011)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (Agrawal, 2011; Jadhav et al, 2013) بررسی شده است.

گیاه لعل کوهستان *Oliveria decumbens* متعلق به خانواده *Apiacea* است. لعل کوهستان جزء گیاهان دارویی محسوب می‌شود و به صورت اندمیک در جنوب و جنوب غرب ایران وجود دارد. از مهمترین ترکیبات این گیاه می‌توان به تیمول اشاره کرد. اثرات ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی این گیاه در شرایط آزمایشگاهی توسط محققین مورد بررسی قرار گرفته و اثبات شده، از جمله Haji و همکاران (2010) گزارش نمودند که اسانس گیاه لعل کوهستان فعالیت ضدمیکروبی بالایی بر *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سوبتلیس* ، *اشریشیا کلی*، *آسپرژیلوس نایجر* و *کاندیدا آلبیکنز* دارد در حالی که بر *سودوموناس آئروژینوزا* اثر کمی دارد. آن‌ها مهم‌ترین ترکیبات اسانس گیاه را γ-terpinene, myristicin, thymol, ρ-cymene and carvacrol اعلام نمودند. Mahboubi و همکاران (2008) بیان نمودند که اثر ضدمیکروبی اسانس گیاه لعل کوهستان بر باکتری‌های گرم مثبت بیش از باکتری‌های گرم منفی است. در این مطالعه مقاوم‌ترین باکتری به این اسانس *سودوموناس آئروژینوزا* اعلام گردید. علاوه بر این گزارشات زیادی نیز در خصوص اثرات اسانس‌های مختلف بر بیوفیلم باکتری استافیلوکوکوس ارئوس نیز منتشر شده است (Almeida et al, 2022; Ersanli et al, 2023).

تا کنون مطالعات مختلفی در مورد ترکیبات، خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی اسانس گیاه لعل کوهستان انجام شده است، اما اطلاعاتی در مورد تأثیر ترکیبات این گیاه بر بیوفیلم باکتریایی اطلاعاتی در دسترس نیست. هدف اصلی این مطالعه بررسی اثرات اسانس گیاه لعل کوهستان در غلظت‌های کمتر از غلظت کشنده بر بیوفیلم *استافیلوکوکوس اورئوس* بوده است.

مواد و روش کار

تهیه سویه‌های باکتری

در این مطالعه چهار جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* تشکیل دهنده قوی بیوفیلم جدا شده از مواد لبنی (شیر و

پنیر) و انسان مورد بررسی قرار گرفت. جدایه‌ها از ذخیره باکتریایی بخش بهداشت مواد غذایی و باکتری‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه بوعلی سینا تهیه شدند. سویه-های ارسالی ابتدا بر روی محیط کشت Baird Parker Agar (MERCK, German) کشت و جداسازی شده و سپس با تکنیک PCR مورد شناسایی و تایید قرار گرفتند (Moghadam et al, 2022). سویه استادارد *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC 25923)، به عنوان کنترل مثبت و تشکیل دهنده بیوفیلم قوی و سویه استاندارد *استافیلوکوکوس اپیدرمیس* (ATCC12228) به دلیل عدم توانایی تشکیل بیوفیلم، به عنوان کنترل منفی از بخش میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه بوعلی تهیه شدند. سویه‌های میکروبی تا هنگام انجام آزمایش در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. به منظور احیا، سویه‌های میکروبی در محیط کشت TSB (tryptic soy Broth, MERCK) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند.

تهیه اسانس گیاه و تعیین ترکیبات اسانس

گیاه تازه *لعل کوهستان* (*Oliveria decumbens*) در مرحله گلدهی کامل در ماه‌های خرداد و تیر از شمال شرق استان خوزستان جمع‌آوری و توسط دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز شناسایی و تایید شد. سپس گیاهان چیده شده شامل برگ و شاخه‌های کوچک در دمای اتاق و در محل تاریک به مدت ده روز خشک شدند. فرایند اسانس‌گیری گیاهان خشک شده به وسیله دستگاه کلونجر به مدت سه ساعت انجام شد. اسانس‌ها در ظروف درب دار تیره رنگ و استریل جمع‌آوری شدند و تا زمان انجام آزمایشات در یخچال نگهداری شدند.

ترکیبات اسانس گیاه *لعل کوهستان* توسط توسط کروماتوگرافی گازی تحلیلی همراه با آشکارساز طیف سنج جرمی (Agilent 5977B, USA) در آزمایشگاه مرکزی دانشگاه شهید چمران اهواز تعیین شد. ستون لوله موئینی (HP-5MS) با طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت فیلم ۰/۲۵ میکرومتر بود. از گاز هلیوم با میزان جریان ۱/۱ میلی‌لیتر در دقیقه استفاده استفاده شد و ۰/۲ میکرولیتر از نمونه جهت آنالیز به داخل دستگاه تزریق شد.

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد و حداقل غلظت کشندگی اسانس

اندازه‌گیری مقادیر MIC[1] و MBC[2] با روش رقت‌سازی در محیط کشت مایع (Serial Micro-dilution) انجام شد. رقت‌های ۱/۲ از اسانس در محیط کشت (Merck, Germany)TSB[3] تهیه شد و در میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای از رقت ۴ تا ۰/۰۱۵ میکرولیتر در میلی‌لیتر رقیق‌سازی و سپس به هر چاهک سوسپانسیون میکروبی با غلظت تقریبا (1×10^6CFU/ml) اضافه شد. غلظت سوسپانسیون میکروبی توسط شمارش میکروبی روی محیط کشت TSA[4](Merck, Germany) تعیین شد. کنترل منفی گوده حاوی محیط کشت TSB بدون کشت باکتری و کنترل مثبت حاوی کشت باکتری بدون اسانس بود. پس از پایان انکوباسیون (۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد) کدورت گوده‌ها بررسی و کم‌ترین غلظتی که در آن هیچ رشد قابل مشاهده‌ای از باکتری دیده نمی‌شد به عنوان MIC در نظر گرفته شد. از همه گوده‌هایی که رشد باکتری در آن‌ها قابل مشاهده نبود به میزان ۱۰ میکرولیتر بر روی محیط کشت TSA کشت داده شد و غلظتی که در پلیت مربوط به آن هیچ رشد باکتری اتفاق نیفتاد به عنوان MBC در نظر گرفته شد (Liu et al, 2017).

1 Minimum Inhibitory Concentration
2 Minimum Bactericidal Concentration
3 Tryptic Soy Broth
4 Tryptic Soy Agar

تأثیر اسانس لعل کوهستان بر بیوفیلم

در این مرحله ابتدا ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت TSB به همراه باکتری‌های مورد نظر با غلظت (1×10^6CFU/ml) در میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای ریخته شده و ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. مایع رویی گوده‌ها دور ریخته شده و گوده‌ها با PBS شسته شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت همراه با غلظت‌های MIC/2(0.25 µl/ml)، MIC/4(0.125 µl/ml) ، MIC/8(0.0625 µl/ml) و MIC/16(0.0126 µl/ml) به گوده‌ها اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون شد. پس از انکوباسیون مایع داخل گوده‌ها تخلیه شده و سلول-های چسبیده به کف گوده‌ها با کریستال ویوله ۱ درصد به مدت ۱۵دقیقه در دمای اتاق رنگ‌آمیزی شدند. سپس کریستال ویوله از گوده‌ها تخلیه و پس از افزودن ۱۰۰ میکرولیتر اتانول-استیک اسید جذب نوری آن‌ها در ۵۷۰ nm به وسیله دستگاه میکروپلیت ریدر (BioTek, Winooski, VT, USA) خوانده شد (Onsare and Arora, 2015).

آنالیز آماری داده‌های حاصل از مطالعه حاضر با استفاده از نرم افزار IBM SPSS Statistics23 و روش آنالیز واریانس دوطرفه، صورت گرفت و در سطح P<۰/۰۵ معنی‌دار، گزارش گردید. همه آزمایش‌ها حداقل در سه تکرار انجام شد.

نتایج

تعیین ترکیبات اسانس

ترکیبات و درصد اسانس (۹۹/۵۶ درصد) مورد نظر با استفاده از روش کروماتوگرافی گازی تعیین شد. نتایج حاصله (Table 1) نشان داد که بیش‌ترین میزان ترکیبات تشکیل دهنده اسانس لعل کوهستان مربوط به منوترپن‌هایی مانند Thymol (۵۳/۴ درصد)، gamma-Terpinene (۲۰/۴۸ درصد) و Cymene (۱۸/۰۲ درصد) می‌باشد.

Table 1: Percentage of chemical compounds of *Oliveria decumbens* essential oil by gas GC-MS

No	RT[1]	RI[2]	Compounds	%
1	5.45	924	Alpha-thujene	0.24
2	5.633	932	Alpha-pinene	0.15
3	6.823	974	Beta-pinene	1.16
4	7.23	988	Beta-myrcene	0.4
5	8.071	1014	Alpha- Terpinene	0.12
6	8.368	1020	Cymene	18.02
7	8.488	1024	Limonene	1.5
8	8.569	1026	1,8-Cineole	0.04
9	9.604	1054	Gamma-Terpinene	20.48
10	10.669	1086	Terpinolene	0.05
11	14.228	1174	Terpinene-4-ol	0.6
12	14.806	1186	Alpha. terpineol	0.04
13	18.988	1289	Thymol	53.4
14	19.337	1298	Carvacrol	0.66
15	28.458	1517	Myristicin	2.7
Total				99.56

1. Retention Time
2. Retention index

تعیین MIC و MBC

MIC اسانس گیاه لعل کوهستان برای باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* با استفاده از روش رقت دو برابری اسانس تعیین شد. کم‌ترین غلظتی که هیچ رشد میکروبی قابل مشاهده‌ای در مقایسه با گروه کنترل در آن دیده نمی‌شد، غلظت ۰/۵ µl/ml بود. پس از کشت همه غلظت‌هایی که رشد میکروبی قابل مشاهده‌ای نداشتند روی محیط کشت TSA (MERCK, German) ، کم‌ترین غلظتی

که هیچ رشد میکروبی روی پلیت‌ها نداشت و به عنوان MBC در نظر گرفته شد غلظت ۱ µl/ml بود.

اثر اسانس لعل کوهستان

به منظور بررسی اثر اسانس لعل کوهستان بر بیوفیلم از روش میکروتیتر پلیت استفاده شد. نتایج حاصل، در Figure 1 قابل مشاهده است. اسانس لعل کوهستان در غلظت‌های MIC/2 ، MIC/4 ، MIC/8 ، MIC/16 تأثیر مناسبی بر بیوفیلم *استافیلوکوکوس اورئوس*های جدا شده از انسان و مواد غذایی داشته و تأثیر آن نیز وابسته به غلظت اسانس می‌باشد. تفاوت تأثیر اسانس بر بیوفیلم توسط باکتری‌های جدا شده از انسان و مواد غذایی معنی‌دار ($P<0.05$) نمی‌باشد.

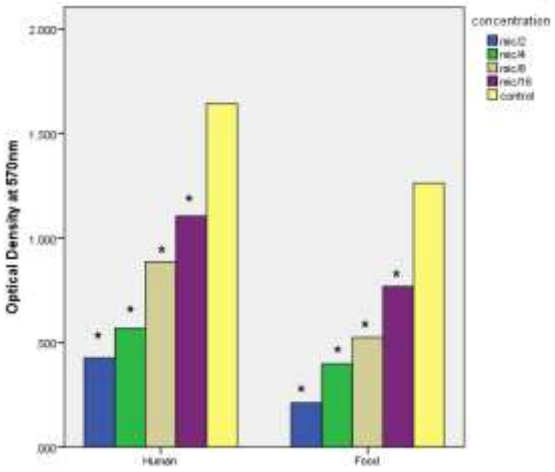

Figure 1: Effect of *Oliveria decumbens* essential oil on *S. aureus* biofilm isolated from humans and food ($p<0.05$)*

بحث

بیماری‌های منتقله از غذا طیف وسیعی از بیماری‌ها را پوشش می‌دهند و توسط عواملی که همراه با غذا مصرف می‌شوند، ایجاد می‌گردند. بر اساس اعلام سازمان بهداشت جهانی بیماری‌های ناشی از غذا یک مشکل بهداشت عمومی در کشورهای توسعه یافته و درحال توسعه می‌باشد (WHO Organization, 2015). دیده شده است که بسیاری از شیوع پاتوژن‌ها مرتبط با بیوفیلم‌ها می‌باشد. علاوه بر بیماری‌های منتقله از طریق غذا تشکیل بیوفیلم‌ها در صنایع غذایی موجب آسیب به تجهیزات و خسارات اقتصادی می‌شوند. بیوفیلم‌ها توانایی باکتری‌ها را برای زنده ماندن در برابر تنش‌ها افزایش می‌دهند و مخازن بالقوه‌ای برای پاتوژن‌هایی مانند *استافیلوکوکوس اورئوس* ایجاد می‌کنند که ممکن است منجر به مسمومیت غذایی شوند (Di Ciccio et al, 2015). با توجه به اهمیت بالای بیوفیلم *استافیلوکوکوس اورئوس* در پزشکی و صنایع غذایی، مطالعات مختلفی برای درک بهتر توسعه و گسترش آن‌ها و همچنین ارائه راه‌های مؤثر برای کنترل و پیش‌گیری از تشکیل بیوفیلم‌ها انجام شده است (Chen et al, 2020).

پس از آنالیز اسانس با استفاده از روش GC-MS ترکیبات تشکیل دهنده و میزان آن‌ها در اسانس مشخص شد. بر اساس نتایج حاصل کروماتوگرافی گازی، اصلی‌ترین ترکیبات اسانس شامل تیمول، گاما ترپینن، سایمن و کارواکرول بود که با توجه به حضور این ترکیبات، خواص ضدمیکروبی قوی برای این اسانس دور از انتظار نبود. با توجه به داده‌های جمع‌آوری شده، اطلاعات کمی در مورد ترکیبات شیمیایی و خواص اسانس لعل کوهستان وجود دارد. به طور مثال Haji و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند که اجزای اصلی اسانس شامل γ–ترپینن، میریستسین، تیمول، ρ–سیمن و کارواکرول است. Amin و همکاران (۲۰۰۵) در گزارش دیگری عنوان کردند که تیمول (۴۷/۰۶ درصد) ترکیب اصلی در اسانس لعل کوهستان است. آن‌ها سایر ترکیبات مؤثره اسانس را کارواکرول (۲۳/۳۱ درصد) ترپینن (۱۸/۹۴ درصد) ρ–سایمن (۸/۷۱ درصد)، لیمونن (۰/۷۶ درصد) و میریستسین (۰/۶۳ درصد) اعلام کردند. مطالعه دیگری روی اسانس لعل کوهستان توسط Mahboubi و همکاران (۲۰۰۸) انجام شد. آن‌ها گزارش کردند که که اجزای اصلی اسانس شامل تیمول (۲۶/۹ درصد)، ρ–سایمن (۱۳/۳ درصد)، γ –ترپینن (۱۱درصد) و کارواکرول (۰/۲۵ درصد) است. بررسی و مقایسه مطالعات قبلی با نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که ترکیبات اصلی اسانس گیاه لعل کوهستان تقریبا در تمام مطالعات مشابهت

نسبی دارد. اختلاف در ترکیبات اسانس را می‌توان به عوامل مختلفی مانند آب و هوا، فصل، مرحله رشد، زمان جمع‌آوری گیاهان و شرایط اقلیمی مرتبط دانست (Bazargani and Rohloff, 2016).

در مورد تأثیر اسانس لعل کوهستان بر بیوفیلم باکتریایی تا کنون مطالعه‌ای انجام نشده است. با توجه به خاصیت ضدمیکروبی قابل توجه این اسانس علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* و همچنین مطالعه قبلی انجام شده (Moghadam et al, 2022) در زمینه تأثیر اسانس بر پیش‌گیری از تشکیل بیوفیلم *استافیلوکوکوس اورئوس* انتظار می‌رفت که لعل کوهستان فعالیت ضد بیوفیلمی مناسبی نیز داشته باشد. نتایج نیز نشان داد که هنگامی که غلظت‌های کم‌تر از MIC اسانس به کار برده شد، اسانس لعل کوهستان فعالیت ضد بیوفیلم مناسبی در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس*های جدا شده از انسان و مواد غذایی دارد. یکی از ترکیبات اصلی اسانس لعل کوهستان تیمول می‌باشد. تیمول مجموعه‌ای از ترکیبات غیر قطبی است که قابلیت انحلال و نفوذ به غشا سلولی باکتری را دارد. این ترکیب همراه با کارواکرول الگوی ضد باکتریایی خود را با مهار بیوسنتز ارگوسترول و تخریب یکپارچگی غشاء اعمال می‌کنند (Behbahani et al, 2018). طبق نتایج به دست آمده و مقایسه با مطالعه قبلی می‌توان گفت که برای کاربرد اسانس‌ها، علیه بیوفیلم پاتوژن‌ها و عوامل فساد مواد غذایی نیاز به غلظت‌های بالاتری از اسانس و یا ترکیب آن‌ها با سایر عوامل ضدعفونی کننده می‌باشد (Sharifi et al, 2018). از آن جایی که بیوفیلم‌های بالغ مقاومت بالایی در برابر عوامل پاک کننده و ضدعفونی کننده از خود نشان می‌دهند، مهار و یا جلوگیری از تشکیل بیوفیلم یک رویکرد کاربردی‌تر و امیدوارکننده است (Nickel et al, 1985). به دلیل پیچیدگی ساختار و عوامل متعدد دخیل در تشکیل بیوفیلم‌ها تنها استفاده از یک روش برای بررسی بیوفیلم‌ها کافی نیست و مطالعه بیوفیلم‌ها نیاز به استفاده از تکنیک‌های مختلف با ابعاد گسترده‌تری دارد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که اسانس گیاه لعل کوهستان فعالیت قابل قبولی علیه بیوفیلم باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* دارد.

با توجه به مطالعات انجام شده می‌توان گفت، گیاهان دارویی می‌توانند منابع غنی و مفیدی برای تولید محصولات جدید برای مبارزه با بیوفیلم‌ها باشند (Szczepanski and Lipsk, 2014). مواد ضدعفونی کننده شیمیایی همچنان به طور گسترده توسط صنایع غذایی برای ضدعفونی سطوح تماس با مواد غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرند. از آن جایی که گزارش شده است که برخی از ضدعفونی‌کننده‌های شیمیایی محصولات جانبی ناسالم تولید می‌کنند (Bazargani and Rohloff, 2016) و همین طور با توجه به افزایش مقاومت باکتری‌ها به ترکیبات شیمیایی و ضدعفونی کننده‌ها، ترکیبات جایگزین و طبیعی نیاز به بررسی دارند. طبق بررسی‌های انجام شده در مطالعات مختلف، نشان داده شد که از اسانس‌ها می‌توان به عنوان ضدعفونی کننده‌های طبیعی برای رفع آلودگی‌های سطوح در تماس با مواد غذایی استفاده کرد و بنابراین خطر انتقال غیرمستقیم پاتوژن‌های باکتریایی به غذا یا افراد را کاهش داد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز، جهت پشتیبانی مالی این تحقیق سپاسگذاری می‌کنیم.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچ تضاد منافعی ندارند.

منابع مالی

هزینه‌های این پژوهش توسط پژوهانه شماره SCU.VF 99.534 معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز تأمین شده است.

منابع

Abdallah, M., Benoliel, C., Drider, D., Dhulster, P., & Chihib, N.-E. (2014). Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. *Archives of microbiology*, *196*(7), 453-472.

Agrawal, I. (2011). Susceptibility of bacterial biofilms against some leaf extracts. *Plant Sciences Feed*, *1*(5), 69-73.

Almeida, L., Lopes, N., Gaio, V., Cavaleiro, C., Salgueiro, L., Silva, V., & Cerca, N. (2022). Thymbra capitata essential oil has a significant antimicrobial activity against methicillin-resistant Staphylococcus aureus pre-formed biofilms. *Letters in Applied Microbiology*, *74*(5), 787-795.

Amin, G., Sourmaghi, M. S., Zahedi, M., Khanavi, M., & Samadi, N. (2005). Essential oil composition and antimicrobial activity of Oliveria decumbens. *Fitoterapia*, *76*(7-8), 704-707.

Bazargani, M. M., & Rohloff, J. (2016). Antibiofilm activity of essential oils and plant extracts against Staphylococcus aureus and Escherichia coli biofilms. *Food Control*, 61, 156-164.

Behbahani, B. A., Yazdi, F. T., Vasiee, A., & Mortazavi, S. A. (2018). Oliveria decumbens essential oil: Chemical compositions and antimicrobial activity against the growth of some clinical and standard strains causing infection. *Microbial Pathogenesis*, 114, 449-452.

Chen, Q., Xie, S., Lou, X., Cheng, S., Liu, X., Zheng, W., Wang, H. (2020). Biofilm formation and prevalence of adhesion genes among Staphylococcus aureus isolates from different food sources. *Microbiologyopen*, 9(1), e00946.

CLSI. (2012). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically: Approved Standard. M07-A9. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

Di Ciccio, P., Vergara, A., Festino, A., Paludi, D., Zanardi, E., Ghidini, S., & Ianieri, A. (2015). Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* on food contact surfaces: Relationship with temperature and cell surface hydrophobicity. *Food Control*, 50, 930-936.

Fratamico, P. M., Annous, B. A., & Guenther, N. (2009). Biofilms in the food and beverage industries: Elsevier.

Ersanli, C., Tzora, A., Skoufos, I., Fotou, K., Maloupa, E., Grigoriadou, K., ... & Zeugolis, D. I. (2023). The Assessment of Antimicrobial and Anti-Biofilm Activity of Essential Oils against Staphylococcus aureus Strains. *Antibiotics*, *12*(2), 384

Haji, M.H., Samadi, N., Mozafarian, V., Rahimifard, N., Shoeybi, S., & Pirali, H. M. (2010). Chemical composition and antimicrobial activity of *Oliveria decumbens* volatile oil from West of Iran.

Jadhav, S., Shah, R., Bhave, M., & Palombo, E. A. (2013). Inhibitory activity of *yarrow* essential oil on Listeria planktonic cells and biofilms. *Food Control*, *29*(1), 125-130.

Lin, Lin, Pin Zhang, Xiaochen Chen, Wei Hu, Mohamed A. Abdel-Samie, Changzhu Li, and Haiying Cui. "Inhibition of Staphylococcus aureus biofilms by poly-L-aspartic acid nanoparticles loaded with Litsea cubeba essential oil." *International Journal of Biological Macromolecules 242* (2023): 124904.

Liu, M., Wu, X., Li, J., Liu, L., Zhang, R., Shao, D., & Du, X. (2017). The specific anti-biofilm effect of gallic acid on *Staphylococcus aureus* by regulating the expression of the ica operon. *Food Control*, 73, 613-618.

Mahboubi, M., Feizabadi, M., Haghi, G., & Hosseini, H. (2008). Antimicrobial activity and chemical composition of essential oil from *Oliveria decumbens* Vent. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research*, 24(1), 56-65. (Moghadam, Maktabi, Zarei, & Koohi, 2022)

Moghadam, M. J., Maktabi, S., Zarei, M., & Koohi, P. M. (2022). Inhibitory Activity of Oliveriadecumbens Essential Oil on Staphylococcus aureus Biofilm and Planktonic Cells. *Avicenna Journal of Clinical Microbiology and Infection*, *9*(3), 109-114.

Nickel, J., Ruseska, I., Wright, J., & Costerton, J. (1985). Tobramycin resistance of Pseudomonas aeruginosa cells growing as a biofilm on urinary catheter material. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 27*(4), 619-624.

Nikravan, L., Maktabi, S., Ghaderi Ghahfarrokhi, M., & Mahmoodi Sourestani, M. (2021). The comparison of antimicrobial and antioxidant activity of essential oil of Oliveria decumbens and its nanoemulsion preparation to apply in food industry. *Iranian Veterinary Journal*, 17(3), 78-87.

Rode, T. M., Langsrud, S., Holck, A., & Møretrø, T. (2007). Different patterns of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* under food-related stress conditions. *International journal of Food Microbiology, 116*(3), 372-383.

Sandasi, M., Leonard, C., Van Vuuren, S., & Viljoen, A. (2011). *Peppermint* (Mentha piperita) inhibits microbial biofilms in vitro. *South African Journal of Botany, 77*(1), 80-85.

Sharifi, A., Mohammadzadeh, A., Zahraei Salehi, T., & Mahmoodi, P. (2018). Antibacterial, antibiofilm and antiquorum sensing effects of Thymus daenensis and Satureja hortensis essential oils against Staphylococcus aureus isolates. *Journal of Applied Microbiology, 124*(2), 379-388.

Srey, S., Jahid, I. K., & Ha, S.-D. (2013). Biofilm formation in food industries: a food safety concern. *Food Control, 31*(2), 572-585.

Szczepanski, S., & Lipski, A. (2014). Essential oils show specific inhibiting effects on bacterial biofilm formation. *Food Control, 36*(1), 224-229.

Van Houdt, R., & Michiels, C. (2010). Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *Journal of Applied Microbiology, 109*(4), 1117-1131.

Received: 21.08.2023
Accepted: 30.04.2024

Vol. 20, No. 4, Winter, 2025 **Original Article**
DOI: 10.22055/ivj.2024.411258.2604

Investigating the effect of *Oliveria decumbens* plant essential oil on the formed *Staphylococcus aureus* biofilm

Mahshad Javid moghadam[1], Siavash Maktabi[2*], Mehdi Zarei[2] and Pezhman Mahmoodi Koohi[3]

[1] PhD Graduated from Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
[2] Professor, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
[3] Associate Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Science, Bu-Ali Sina University, Hamadan, Iran

Received: 21.08.2023 Accepted: 30.04.2024

Abstract

Staphylococcus aureus is a gram-positive and pathogenic bacterium that causes many problems in the field of medicine, veterinary and food industry. Most microorganisms, including *Staphylococcus aureus*, are able to attach and form biofilms on different surfaces. The formation of biofilm increases the resistance of bacteria to environmental stresses, antimicrobial compounds and disinfectants. In this study, the effect of the *Oliveria decumbens* essential oil on the biofilm formed by *Staphylococcus aureus* isolated from humans and food (dairy) was investigated using the microtiter plate method. The results of the present study showed that *Oliveria decumbens* essential oil has a significant destructive effect on *Staphylococcus aureus* bacteria and the difference in the effect of essential oil on the biofilm formed by bacteria isolated from humans and food is not significant. Considering the effect of *Oliveria decumbens* essential oil on *Staphylococcus aureus* biofilm, this essential oil can be used as an effective agent in controlling bacterial biofilms.

Key words: Biofilm, *Staphylococcus aureus*, *Oliveria decumbens*, Essential Oil

[*] **Corresponding Author**: Siavash Maktabi, Professor, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
E-mail: s.maktabi@scu.ac.ir

© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).