

اوزنول: عامل کارآمد مهارکننده سیستم Quorum Sensing برای کاهش بیماری‌زایی سودوموناس آئروژینوزا

صبا مسلمی^۱ و نسیم کاشف^{۲*}

۱- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، بخش میکروبیولوژی، دانشکده زیست‌شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران
 ۲- نویسنده مسئول، دانشیار، باکتری‌شناسی پزشکی، بخش میکروبیولوژی، دانشکده زیست‌شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران
 پست الکترونیک: kashfn@khayam.ut.ac.ir

تاریخ دریافت: اسفند ۱۳۹۸

تاریخ اصلاح نهایی: مرداد ۱۳۹۹

تاریخ پذیرش: مهر ۱۳۹۹

چکیده

سودوموناس آئروژینوزا یک بیماری‌زای فرصت‌طلب انسانی است. این باکتری یکی از مهمترین عوامل عفونت‌های بیمارستانی در طیف وسیعی از بیماران دارای نقص سیستم ایمنی شامل افراد مبتلا به بدخیمی‌ها، مبتلایان به سیستمیک فیبروز و سوختگی‌ها است. این باکتری دارای عوامل بیماری‌زایی متعددی است و به دلیل تولید بیوفیلم، مقاومت زیادی به بیشتر آنتی‌بیوتیک‌های متداول دارد. تولید بسیاری از عوامل بیماری‌زایی در این باکتری تحت کنترل سیستم quorum sensing (QS) است. سیستم QS یک هدف جذاب برای طراحی درمان‌های جدید است. اوزنول ماده اصلی تشکیل‌دهنده عصاره میخک (*Eugenia caryophyllata*) است. مطالعات پیشین اثرهای ضد باکتریایی آن را نشان داده‌اند. هدف از این مطالعه بررسی اثر ضد QS اوزنول بر تشکیل بیوفیلم و تولید عوامل بیماری‌زایی تنظیم شده با سیستم QS در سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا بود. حداقل غلظت مهارکنندگی اوزنول (MIC) برای دو سویه سودوموناس آئروژینوزا ATCC ۲۷۸۵۳ و PAO1 و سه جدایه بالینی تعیین شد. سپس اثر اوزنول بر تکثیر میکروبی با کنترل منحنی رشد انجام شد. تشکیل بیوفیلم و تولید آگزوپلی‌ساکارید، پیوسیانین و رامنولیپید، حرکت Swarming، Swimming و Twitching پس از تیمار با اوزنول بررسی شد. کمترین غلظت مهارکننده اوزنول برای دو سویه سودوموناس آئروژینوزا ۲۷۸۵۳ ATCC و PAO1 به ترتیب ۰/۳ (v/v) و ۰/۶ (v/v) تعیین شد. غلظت‌های مختلف اوزنول ($\geq 0.15\%$) به طور معنی‌داری منجر به کاهش تولید عوامل بیماری‌زا از جمله تولید پیوسیانین و رامنولیپید شدند. همچنین تشکیل بیوفیلم، تولید آگزوپلی‌ساکارید و حرکت twitching، swimming، و swarming پس از تیمار با اوزنول کاهش یافت. به این ترتیب، استفاده از اوزنول به عنوان یک عامل مهارکننده سیستم QS و ضد بیوفیلم می‌تواند راهکار درمانی مؤثری برای مقابله با عفونت‌های حاصل از سودوموناس آئروژینوزا باشد.

واژه‌های کلیدی: سودوموناس آئروژینوزا، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، عوامل بیماری‌زایی، سیستم QS، اسانس‌های روغنی.

مقدمه

سودوموناس آئروژینوزا یک بیماری‌زای فرصت طلب است که می‌تواند در طیف وسیعی از بیماران دارای نقص سیستم ایمنی عفونت‌های حاد و مزمن ایجاد کند. توانایی سودوموناس آئروژینوزا در هجوم به بافت‌ها به تولید آنزیم‌های خارج سلولی و توکسین‌ها بستگی دارد که منجر به شکستن سدهای فیزیکی شده و به سلول‌های میزبان آسیب می‌زند. تولید عوامل بیماری‌زای متنوع همانند آلترینات، پروتئازها، پیوسیانین، رامنولیبید، فسفولیپاز C، آگزوتوکسین A، پیلی و تشکیل بیوفیلم سبب شده است که سودوموناس آئروژینوزا در زمره مهمترین باکتری‌های بیماری‌زا قرار گیرد (Kim et al., 2015). از سویی، گسترش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا سبب نگرانی جدی برای سلامتی انسان شده است.

در سودوموناس آئروژینوزا بیشتر عملکردها و تولید عوامل بیماری‌زا توسط سیستم Quorum sensing (QS) کنترل می‌شود. در فرایند QS باکتری‌ها با تولید و پاسخ به مولکول‌های پیام‌رسان، حضور سایر باکتری‌ها را در محیط اطراف خود ردیابی می‌کنند. سودوموناس آئروژینوزا چهار سیستم QS (*iqs* و *pqs rhl las*) دارد که همگی در تولید عوامل بیماری‌زا و تشکیل بیوفیلم تعامل دارند. سیستم QS باکتری سودوموناس آئروژینوزا به دلیل ایجاد اختلال در سیستم دفاعی میزبان، در بیماری‌زایی این باکتری حائز اهمیت است (Williams et al., 2000). بیوفیلم سودوموناس آئروژینوزا در ریه افراد مبتلا به فیبروز سیستیک تشکیل می‌شود. در این باکتری بیوفیلم که عمدتاً از آگزوپلی‌ساکارید تشکیل شده است، قادر به تحمل نیروهای فیزیکی جداکننده سلول‌های منفرد است و در برابر فاگوسیتوز سلول‌های ایمنی میزبان مقاوم است. به این ترتیب نفوذ آنتی‌بیوتیک بسیار دشوار می‌شود (Madigan et al., 2010). بسیاری از عوامل بیماری‌زای تحت کنترل سیستم QS از جمله رامنولیبید، پیوسیانین، حرکت

swarming، twitching و در تکامل و تشکیل بیوفیلم نقش ایفاء می‌کنند. از این رو تداخل در سیستم QS و به دنبال آن کاهش در تولید عوامل بیماری‌زا، یک هدف عالی برای گسترش درمان‌های ضد میکروبی علیه سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک است (Zhou et al., 2013). تداخل در سیستم QS شامل فرایندهایی هدفمند است که این سیستم را بدون اثر بر رشد باکتری هدف قرار می‌دهند. امروزه عصاره‌های گیاهی و اجزاء تشکیل‌دهنده آنها به‌عنوان ترکیب‌های مهارکننده طبیعی سیستم QS قادر به ایجاد اختلال در مراحل مختلف این سیستم مانند ممانعت از سنتز مولکول‌های پیام‌رسان، تخریب مولکول پیام‌رسان و آنالوگ‌های مولکول‌های پیام‌رسان مورد استفاده قرار می‌گیرند (Roche et al., 2004).

اوژنول (4-allyl-2-methoxyphenol) یک ماده فیتوشیمیایی فنلی است که عمدتاً از جوانه‌های میخک (*Eugenia caryophyllata*) بدست می‌آید. گیاه دارچین، آویشن، جوز هندی و زردچوبه از منابع دیگر اوژنول هستند. در مطالعات اخیر نشان داده شده است که اوژنول دارای خواص ضد التهابی، بی‌حسی، آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی و ضد سرطان است (Mahapatra & Roy, 2014؛ Yogalakshmi et al., 2010). علاوه بر این، اثرهای ضد QS اوژنول روی *Chromobacterium violaceum* CV026 و اثر مهارکننده روغن میخک روی باکتری‌های *Aeromonas hydrophila* و *Porphyromonas gingivalis* مطالعه شده است (Zhou et al., 2013؛ Husain et al., 2013؛ Zhang et al., 2017). در این مطالعه، مهار عوامل بیماری‌زای تحت کنترل سیستم QS توسط اوژنول در سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا ATCC ۲۷۸۵۳، سودوموناس آئروژینوزا PAO1 و سه سویه بالینی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی و سویه‌ها

خلوص اوژنول تجاری (Sigma, USA) مورد استفاده

اوژنول در محدوده غلظت (v/v) ۰/۰۷۸۱ تا ۱۰٪ تهیه شد. سپس اوژنول به همراه محیط کشت MHB به اندازه ۱۰۰ میکرولیتر به چاهک اول از پلیت ۹۶ خانه‌ای اضافه شد تا غلظت نهایی اوژنول ۱۰٪ باشد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از اولین چاهک به چاهک دوم انتقال داده شد و به همین ترتیب تا چاهک دهم رقت‌سازی انجام شد (رقت‌سازی دوتایی). سوسپانسیون رقیق شده باکتری به هر چاهک اضافه شد تا چاهک‌های تلقیح شده با غلظت نهایی (CFU/ml) $10^5 \times 1/5$ بدست آید. این سوسپانسیون تلقیحی به روش مقایسه چشمی با استاندارد ۰/۵ مک فارلند (CFU/ml) $10^8 \times 1/5$ تا رسیدن به غلظت مناسب رقیق شد. پلیت ۹۶ خانه‌ای (SPL, Korea) به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور شیکردار (۱۲۰rpm) گرمخانه‌گذاری شد. در نهایت ایجاد کدورت و رشد باکتری به صورت چشمی بررسی گردید.

برای تعیین حداقل غلظت کشنده باکتریایی، بعد از ۲۴ ساعت، از چاهک‌های شفاف به میزان ۵ میکرولیتر بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار (MHA) (Merck, Germany) برده شد و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. کمترین غلظت مهارکننده به صورت کمترین غلظتی که منجر به رشد باکتری در چاهک‌ها نشود و کمترین غلظت کشنده به صورت کمترین غلظت اوژنول که بیشتر یا مساوی ۹۹٪ از مقدار باکتریهای اولیه تلقیح شده را کاهش دهد، تعریف شد. آزمایش‌ها در ۳ مرحله تکرار شد.

تعیین اثر اوژنول بر رشد باکتری‌ها

برای ارزیابی اثر اوژنول بر رشد باکتری از روشی که Al-Adham و همکاران (۲۰۰۰) توصیف کردند، به همراه کمی تغییرات استفاده شد. بدین منظور ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت LB مایع در ارلن‌های ۵۰ میلی‌لیتری تهیه شد. سوسپانسیون سویه‌های استاندارد و بالینی سودوموناس آئروژینوزا از کشت‌های یک‌شبه، برابر کدورت

در این مطالعه، ۹۹/۵٪ بود. سویه سودوموناس آئروژینوزا PAO1 اهدا شده از طرف پروفیسور Michael R. Hamblin (دانشکده پزشکی دانشگاه هاروارد آمریکا) بود. سویه سودوموناس آئروژینوزا ATCC ۲۷۸۵۳ از بانک میکروبی دانشگاه تهران تهیه شد. سویه *Chromobacterium violaceum* (CV026) اهدایی از طرف پروفیسور Tim Tolker-Nielsen (دانشگاه کپنهاگ دانمارک) بود. جدایه‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا از آزمایشگاه میکروپزشناسی بیمارستان لقمان حکیم گرفته شد. سویه‌ها در محیط کشت Skim milk (Merck, Germany) همراه با ۳۰٪ گلیسرول در دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. قبل از انجام هر آزمایش، سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا بر روی محیط (TSA) Tryptic Soy Agar (Merck, Germany) و سویه *C. violaceum* CV026 بر روی محیط Luria Bertani Broth (LB Broth) (Merck, Germany) کشت داده شدند و به ترتیب ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۴۸ ساعت در ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری گردیدند. تأیید جدایه‌های بالینی از طریق مشاهده خصوصیات ریخت‌شناسی، رنگ‌آمیزی گرم، آزمایش‌های بیوشیمیایی و دیسک اکسیداز انجام شد.

تعیین حداقل غلظت مهارکننده رشد (MIC) و حداقل

غلظت کشنده اوژنول (MBC) برای سویه‌ها

حداقل غلظت مهارکننده و حداقل غلظت کشنده اوژنول برای سویه‌های مورد بررسی طبق دستور مؤسسه استانداردهای آزمایشگاهی و بالینی (CLSI 2018) با روش رقیق‌سازی در مایع تعیین شد. سویه استاندارد و سویه‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا به مدت ۶ تا ۸ ساعت در محیط کشت مولر هینتون برات (MHB) (Merck, Germany) در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. برای کمک به انحلال اوژنول از دی‌متیل سولفوکسید (DMSO) (SRL) (۱٪ حجمی استفاده شد و بعد توسط فیلتر ۰/۴۵ میکرومتر استریل گردید. سریال رقتی با ضریب ۲ از

۰/۵ مک‌فارلند آماده و به نسبت ۱:۱۰۰ رقیق و به ارلن‌ها اضافه شد. اوژنول به همراه ۱٪ DMSO در غلظت‌های MIC و MBC (۱/۲٪، ۰/۶٪، ۰/۳٪) و غلظت پایین‌تر از MIC (۰/۱۵٪) آماده و به ارلن‌ها اضافه شد. برای رسم منحنی رشد، تغییرات رشد باکتری در فواصل زمانی ۱ ساعت به مدت ۱۲ ساعت به روش اسپکتروفوتومتری در OD₆₃₀ با دستگاه (Hiperion, Korea) ELISA reader اندازه‌گیری و ثبت شد. سوسپانسیون باکتری‌ها بدون تیمار اوژنول به‌عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شدند. برای مشخص شدن زمان اثر اوژنول برای تعیین حداقل غلظت کشندگی، هر ساعت به میزان ۵ میکرولیتر بر روی پلیت‌های MHA برده شد و ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. برای رسم منحنی‌های رشد، از نرم‌افزار Graphpad prism6 استفاده شد. آزمایش‌ها در سه مرحله تکرار گردید.

بررسی اثر اوژنول بر شکل‌گیری بیوفیلم میکروسکوپ الکترونی

به‌منظور آماده‌سازی نمونه‌ها، شیشه‌هایی به ابعاد ۱×۱ سانتی‌متر تهیه و در چاهک‌های یک پلیت ۱۲ خانه‌ای (SPL, Korea) قرار داده شدند. سوسپانسیون میکروبی برابر ۰/۵ مک‌فارلند تهیه و به نسبت ۱:۵۰ رقیق و ۵۰۰ میکرولیتر در هر چاهک ریخته شد. اوژنول به همراه ۱٪ DMSO در غلظت (v/v) ۰/۰۷۵ به چاهک افزوده شد. حجم سوسپانسیون درون چاهک‌ها در نهایت یک میلی‌لیتر بود. چاهک‌های بدون تیمار اوژنول به‌عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شدند. پلیت به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور شیکردار (۱۲۰rpm) قرار داده شد. بعد از ۲۴ ساعت چاهک‌ها سه بار با بافر فسفات شستشو شدند و به‌منظور تثبیت بیوفیلم به مدت ۲ ساعت با گلو تار آلدهید ۲/۵٪ در دمای اتاق قرار گرفتند. در ادامه به‌منظور آگیری به مدت ۱۰ دقیقه در غلظت‌های اتانول ۳۵٪، ۵۰٪، ۷۵٪، ۹۰٪ و ۱۰۰٪ قرار داده شدند. سپس ۳۰ دقیقه زمان برای خشک شدن شیشه‌ها داده شد. در

بررسی اثر اوژنول بر شکل‌گیری بیوفیلم

آزمایش‌های تشکیل بیوفیلم با استفاده از پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای پلی‌استیرن با کف صاف (SPL, Korea) براساس روش O'Neill و همکاران (۲۰۰۷) به همراه کمی تغییرات انجام شد. کشت‌های یک‌شبه سویه‌های استاندارد و بالینی سودوموناس آئروژینوزا در محیط کشت تریپتیک سوی برات (TSB) به نسبت ۱:۵۰ رقیق شد و به‌میزان ۱۰۰ میکرولیتر در هر چاهک ریخته شد. اوژنول حل شده در DMSO به چاهک‌ها اضافه شد تا غلظت نهایی اوژنول در چاهک‌ها در بازه (v/v) ۰/۰۷۵-۰/۱۵٪ و مقدار ثابت DMSO ۱٪ بدست آید. چاهک‌های بدون تلقیح باکتری شامل TSB، اوژنول و DMSO به‌عنوان کنترل منفی و چاهک‌های حاوی TSB به همراه تلقیح باکتری به‌عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد (انکوباتور شیکردار ۱۲۰rpm)، محیط درون چاهک‌ها با رعایت شرایط استریل با سمپلر تخلیه و با محلول نمکی بافر فسفات (۱ مولار،

۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی تلقیح شد. پلیت‌های بدون تیمار اوژنول به‌عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شدند. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری گردیدند. آزمایش‌ها با ۳ تکرار در ۳ نوبت جداگانه انجام شد (Rashid & Kornberg, 2000).

بررسی اثر اوژنول بر حرکت **Swimming**

محیط کشت برای سنجش حرکت **swimming** شامل محیط LB مایع به همراه ۰/۵٪ گلوکز و ۰/۳٪ آگار بود. اوژنول در غلظت‌های (v/v) نهایی ذکر شده در بالا به محیط افزوده شد. از کشت‌های یک‌شبه سویه‌های بالینی و استاندارد *سودوموناس آئروژینوزا* با آنس تک کلنی برداشته و به مرکز محیط نزدیک به انتهای پلیت تلقیح شد. پلیت‌های بدون تیمار اوژنول به‌عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شدند. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. آزمایش‌ها با ۳ تکرار در ۳ نوبت جداگانه انجام شد (Rashid & Kornberg, 2000).

بررسی اثر اوژنول بر حرکت **Twitching**

محیط کشت برای سنجش حرکت **Twitching** شامل محیط LB مایع به همراه ۰/۵٪ گلوکز و ۰/۱٪ آگار بود. اوژنول در غلظت‌های ذکر شده در بالا به محیط افزوده شد. سپس محیط کشت به پلیت‌ها اضافه شد تا جایی که قطر محیط ۳ میلی‌متر شود. از کشت‌های یک‌شبه سویه‌های بالینی و استاندارد *سودوموناس آئروژینوزا* با آنس تک کلنی برداشته و به مرکز محیط تلقیح شد، به‌طوری که آنس با کف پلیت برخورد کند. پلیت‌های بدون تیمار اوژنول به‌عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شدند. پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. سپس محیط کشت پلیت‌ها تخلیه شده و با کریستال ویوله ۰/۴٪ رنگ‌آمیزی گردیدند و در نهایت قطر هاله حرکت اندازه‌گیری شد. آزمایش‌ها با ۳ تکرار در ۳ نوبت جداگانه انجام شد (Rashid & Kornberg, 2000).

نهایت شیشه‌ها با استفاده از دستگاه **sputter coater** با ضخامت نانو پوشش طلا داده شدند و با میکروسکوپ الکترونی (DSM-960A) مشاهده گردیدند (Gowrishankar *et al.*, 2014).

بررسی اثر اوژنول بر تولید آگزوپلی ساکارید

همانند بررسی تشکیل بیوفیلم، کشت‌های یک‌شبه سویه‌های استاندارد و بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* در محیط کشت TSB به نسبت ۵۰:۱ رقیق و به‌میزان ۱۰۰ میکرولیتر در هر چاهک ریخته شدند. اوژنول به همراه DMSO به چاهک‌ها اضافه شد تا غلظت نهایی اوژنول در چاهک‌ها در بازه (v/v) ۰/۷۵-۰/۱۵٪ و مقدار ثابت DMSO ۱٪ بدست آید. چاهک‌های بدون تلقیح باکتری شامل TSB، اوژنول و DMSO به‌عنوان کنترل منفی و چاهک‌های حاوی TSB به همراه تلقیح باکتری به‌عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد (انکوباتور شیکردار ۱۲۰rpm)، محیط درون چاهک‌ها با رعایت شرایط استریل با سمپلر تخلیه و با محلول نمکی بافر فسفات به آرامی دو تا سه مرتبه شسته شد تا سلول‌های پلانکتونیک حذف شوند. سپس به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر اسید سولفوریک خالص (۹۹٪) اضافه شد. پس از یک ساعت قرار گرفتن در تاریکی، جذب نوری چاهک‌ها در ۴۹۰ نانومتر به‌وسیله میکروپلیت‌خوان، خوانده شد. آزمایش‌ها در ۳ تکرار انجام شد (Rathinam *et al.*, 2017).

بررسی اثر اوژنول بر حرکت **Swarming**

محیط کشت برای سنجش حرکت **swarming** شامل محیط LB مایع به همراه ۰/۵٪ گلوکز و ۰/۵٪ آگار بود. از کشت‌های یک‌شبه سویه‌های استاندارد و بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* سوسپانسیون باکتریایی با کدورت برابر ۰/۵ مک‌فارلند تهیه شد. اوژنول در غلظت‌های نهایی ذکر شده در بالا به محیط افزوده شد. در نهایت به مرکز پلیت‌ها،

بررسی اثر اوژنول بر تولید رامنولیبید

در این آزمایش، از روش Bhat و همکاران (۲۰۱۵) به همراه کمی تغییرات استفاده شد. برای سنجش میزان تولید رامنولیبید از محیط LB آگار متشکل از ۲٪ گلوکز، ۰/۵٪ CTAB (cetyl trimethylammonium bromide) و ۰/۲٪ متیلن بلو استفاده شد. از کشت‌های یک‌شبه سویه‌ها، سوسپانسیون باکتریایی برابر کدورت ۰/۵ مک‌فارلند آماده شد. اوژنول در غلظت‌های ذکر شده در بالا به محیط افزوده شد. در پلیت‌ها چاهک‌هایی با قطر ۴ میلی‌متر زده شد. سوسپانسیون باکتریایی با کدورت برابر ۰/۵ مک‌فارلند تهیه شد و از آن به میزان ۳۰ میکرولیتر به درون چاهک‌ها تلقیح شد. پلیت‌های بدون تیمار اوژنول به‌عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شدند. پلیت‌ها به مدت ۷۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد در تاریکی گرمخانه‌گذاری شدند. سپس ۶ ساعت در یخچال قرار گرفتند تا هاله تشکیل رامنولیبید واضح شود. پس از آن قطر هاله تشکیل رامنولیبید با دستگاه transilluminator در طول موج ۳۶۵ نانومتر اندازه‌گیری و یادداشت شد. آزمایش در ۳ نوبت جداگانه با ۳ تکرار انجام گردید.

بررسی اثر اوژنول بر تولید پیوسیانین

از کشت‌های یک‌شبه سویه‌های استاندارد و بالینی سودوموناس آئروژینوزا، سوسپانسیون باکتریایی برابر کدورت ۰/۵ مک‌فارلند آماده شد و بعد به نسبت ۱:۱۰ در لوله‌های حاوی ۵ میلی‌لیتر LB مایع رقیق شد. اوژنول به میزان ۱/۸، ۳/۷۵ و ۷/۵ میکرولیتر به ترتیب با غلظت‌های (v/v) ۰/۰۳۷، ۰/۰۷۵ و ۰/۱۵ به همراه DMSO ۱٪ به لوله‌ها اضافه شد. لوله‌ها به مدت ۷۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور شیکردار قرار گرفتند. پس از گذشت ۷۲ ساعت، لوله‌ها به مدت ۲۰ ثانیه ورتکس شدند. ۲ میلی‌لیتر از سوسپانسیون لوله‌ها به میکروتیوب استریل منتقل شده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با ۱۱۰۰۰rpm سانتریفیوژ شدند. یک میلی‌لیتر از سوپرناتانت به میکروتیوب جدید منتقل و یک میلی‌لیتر

کلروفرم به آن افزوده و ورتکس انجام شد تا تغییر رنگ سبز به آبی مشاهده شود. دوباره سانتریفیوژ انجام شد. فاز روشن سوسپانسیون به یک میکروتیوب دیگر منتقل شده و ۵۰۰ میکرولیتر HCl ۰/۱ نرمال به آن افزوده شد. در این مرحله رنگ صورتی ایجاد شد. ۲۰۰ میکرولیتر از هر میکروتیوب به چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای منتقل شد و جذب نوری با میکروپلیت‌خوان در ۵۴۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. جذب خوانده شده در عدد ۱۷/۶۷ ضرب می‌شود تا میزان تولید پیوسیانین بدست آید. لوله‌های بدون تیمار اوژنول به‌عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شدند. آزمایش‌ها در ۳ نوبت جداگانه با ۳ تکرار انجام شد (Chatterjee et al., 2017).

بررسی اثر مولکول‌های پیام‌رسان تولیدی از سودوموناس آئروژینوزا بر سیستم QS *Chromobacterium violaceum* (CV026) در حضور و عدم حضور اوژنول

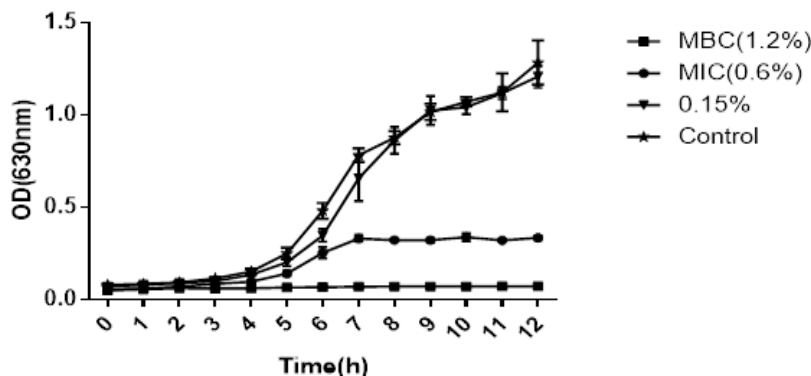
به‌منظور بررسی حضور مولکول‌های پیام‌رسان تولید شده، از باکتری نشانگر *C. violaceum* CV026 طبق روش Zhou و همکاران (۲۰۱۳) با اندکی تغییرات استفاده شد. این باکتری به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. بعد از آماده‌سازی سوسپانسیون با کدورت برابر ۰/۵ مک‌فارلند، به نسبت ۱:۱۰۰ با محیط کشت LB آگار (۷۷/۷٪) ترکیب و به پلیت‌ها منتقل شد. بعد از جامد شدن محیط کشت، چاهک‌هایی به قطر ۵ میلی‌متر در محیط‌ها زده شد. سویه‌های بالینی و استاندارد سودوموناس آئروژینوزا کشت داده شده در LB برات، به میزان ۲ میلی‌لیتر به میکروتیوب استریل منتقل شده و ۱۰ دقیقه با ۱۰۰۰۰rpm سانتریفیوژ شدند. سپس ۵۰ میکرولیتر از این سوپرناتانت به همراه غلظت‌های ذکر شده در بالا از اوژنول به چاهک‌ها منتقل شد. چاهک‌های بدون تیمار اوژنول به‌عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شدند. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. در نهایت پلیت‌ها از نظر تولید رنگدانه بنفش ویولاسئین بررسی شدند.

شدند (MBC=2MIC). در حالی که غلظت‌های (v/v) ۰/۶٪ و (۶ mg/ml) و (v/v) ۱/۲٪ (۱۲ mg/ml) اوژنول به ترتیب به عنوان کمترین غلظت مهارکننده رشد و کمترین غلظت کشنده برای سویه سودوموناس آئروژینوزا PAO1 و سه سویه با منشأ بالینی تعیین شدند (MBC=2MIC).

بررسی اثر اوژنول بر رشد باکتری

در این آزمایش رشد باکتری‌های تیمار شده با اوژنول در غلظت‌های MIC، MBC، غلظت پایین‌تر از غلظت مهارکننده رشد باکتری (۰/۱۵٪) و باکتری‌های تیمار نشده در ساعت‌های متوالی بررسی شد. در هر دو سویه باکتری، اوژنول در غلظت MBC در ساعت اول منجر به مرگ باکتری‌ها شد. در سویه سودوموناس آئروژینوزا PAO1، MIC اوژنول از ساعت ۷ به بعد منجر به مهار رشد باکتری شد (شکل ۱). در سویه سودوموناس آئروژینوزا ۲۷۸۵۳ ATCC، MIC اوژنول از ساعت ۹ به بعد منجر به مهار رشد باکتری شد (شکل ۲).

غلظت ۰/۱۵٪ اوژنول اثری بر رشد باکتری نداشت و به صورت نمایی مانند منحنی باکتری تیمار نشده به رشد خود ادامه داد. با توجه به اینکه در این پژوهش تنها غلظت‌هایی از اوژنول که بر رشد باکتری اثر نداشته باشند مورد توجه بودند، از این رو از غلظت‌های $\geq 0/15\%$ در سایر آزمون‌ها استفاده شد.



شکل ۱- بررسی اثر اوژنول بر رشد باکتری سودوموناس آئروژینوزا PAO1

MBC: اوژنول از ساعت یک به بعد سبب مرگ باکتری شد. MIC: اوژنول از ساعت هفت به بعد منجر به مهار رشد باکتری‌ها شد.

باکتری در غلظت ۰/۱۵٪ اوژنول و در نمونه تیمار نشده به صورت نمایی به رشد خود ادامه داد.

همچنین در روش کشت متقاطع، *C. violaceum* CV026 به صورت خطی در وسط پلیت LB آگار کشت داده شد. سپس سودوموناس آئروژینوزا به صورت متراکم در نزدیکی *C. violaceum* (CV026) کشت داده شد و ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. در نهایت تولید پیگمان ویولاسئین بررسی شد.

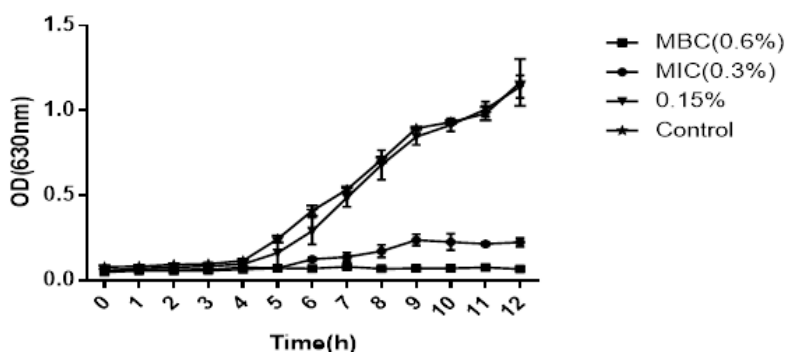
تجزیه و تحلیل آماری نتایج

تجزیه و تحلیل آماری نتایج به وسیله نرم‌افزار GraphPad Prism6 به روش‌های independent t-test و Pair-t-test انجام و برای هر گروه آزمون در مقایسه با گروه شاهد مقدار p value محاسبه شد. مقادیر $p\text{-value} \leq 0/05$ به عنوان تفاوت معنی‌دار بین گروه آزمون و گروه شاهد در نظر گرفته شد. نمودارها به وسیله نرم‌افزار GraphPad Prism6 رسم شدند.

نتایج

تعیین کمترین غلظت مهارکننده رشد و کمترین غلظت کشنده اوژنول برای سودوموناس آئروژینوزا

غلظت‌های (v/v) ۰/۳٪ (۳ mg/ml) و (v/v) ۰/۶٪ (۶ mg/ml) اوژنول به ترتیب به عنوان کمترین غلظت مهارکننده رشد و کمترین غلظت کشنده اوژنول برای سویه استاندارد سودوموناس آئروژینوزا ۲۷۸۵۳ ATCC تعیین



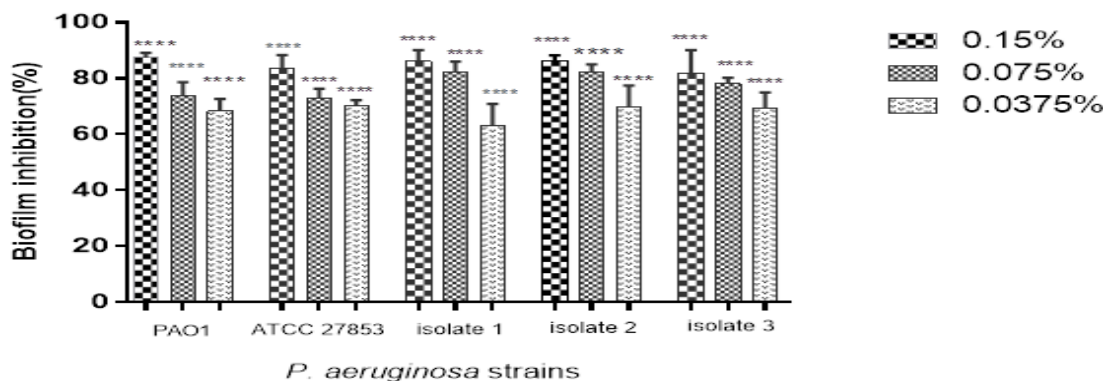
شکل ۲- بررسی اثر اوژنول بر رشد باکتری سودوموناس آئروژینوزا ATCC ۲۷۸۵۳

MBC: اوژنول از ساعت یک به بعد سبب مرگ باکتری شد. MIC: اوژنول از ساعت ۹ به بعد از رشد باکتری ممانعت کرد. باکتری در غلظت ۰/۱۵٪ اوژنول و در نمونه تیمار نشده به صورت نمایی به رشد خود ادامه داد.

سویه‌ها توانایی تشکیل بیوفیلم با افزایش غلظت اوژنول کاهش می‌یابد.

بررسی اثر اوژنول بر تشکیل بیوفیلم

در شکل ۳، درصد مهار تشکیل بیوفیلم سویه‌ها در غلظت‌های تعیین شده اوژنول مشاهده می‌شود. در تمام



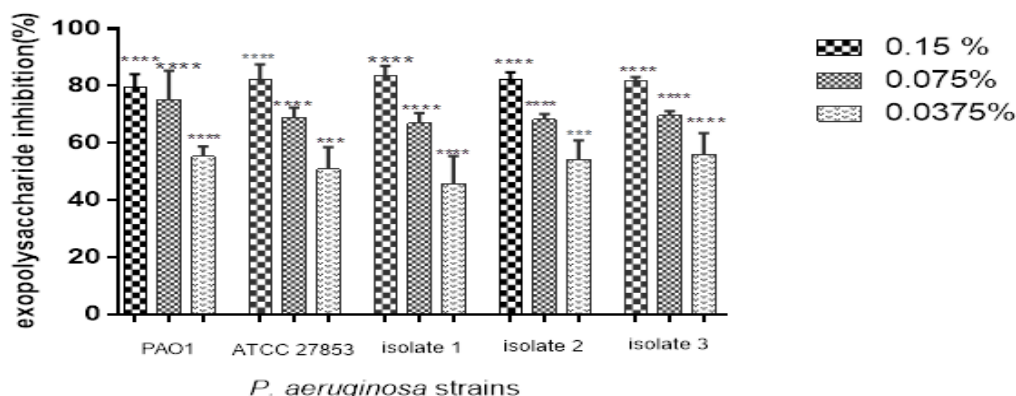
شکل ۳- درصد مهار بیوفیلم در سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا در تیمار با اوژنول پس از ۲۴ ساعت

(*P<۰/۰۵, **P<۰/۰۰۵, ***P<۰/۰۰۰۵, ****P<۰/۰۰۰۱)

شده اوژنول مشاهده می‌شود. آنچه مشخص است با افزایش غلظت اوژنول، درصد مهار تولید اگزوپلی ساکارید در تمام سویه‌ها کاهش می‌یابد.

بررسی اثر اوژنول بر تولید اگزوپلی ساکارید

در شکل ۴، درصد مهار تولید اگزوپلی ساکارید در سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا در غلظت‌های آزمایش



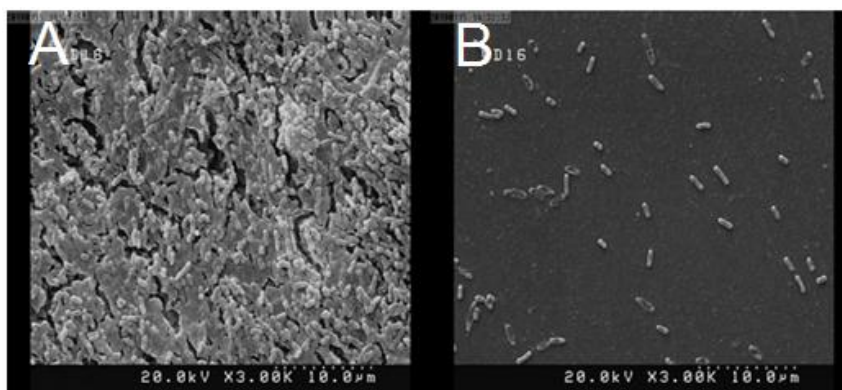
شکل ۴- درصد مهار تولید اگزوپلی ساکارید در سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا در تیمار با اوژنول پس از ۲۴ ساعت

(* $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.0005$, **** $P < 0.0001$)

از این رو تنها از غلظت اوژنول (۰/۰۷۵٪) برای انجام این آزمون استفاده شد. با توجه به شکل‌های ۵ و ۶، بیوفیلم در سویه استاندارد و بالینی در نمونه شاهد (فاقد اوژنول) به طور کامل و قوی تشکیل شده است اما در نمونه‌های تیمار شده تشکیل بیوفیلم مهار شده و سلول‌های باکتریایی به طور پراکنده از هم دیده می‌شوند.

میکروگراف‌های الکترونی

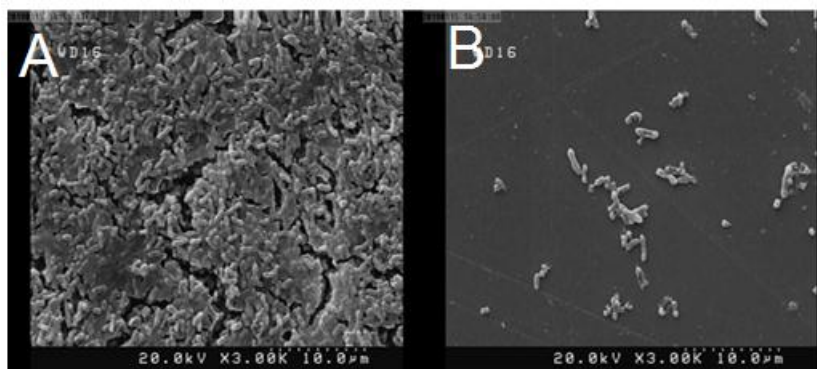
برای مشاهده اثر اوژنول بر توانایی تشکیل بیوفیلم در دو سویه سودوموناس آئروژینوزا PAO1 و سودوموناس آئروژینوزا ATCC ۲۷۸۵۳، باکتری‌های تیمار شده با غلظت ۰/۰۷۵٪ (v/v) اوژنول با نمونه شاهد مقایسه شدند. تجزیه و تحلیل آماری، بین سه گروه غلظت آزمایشی اوژنول تفاوت معنی‌داری را در مهار تشکیل بیوفیلم نشان داد،



شکل ۵- تصاویر بدست آمده از بیوفیلم تشکیل شده بر سطح اسلاید شیشه‌ای سویه سودوموناس آئروژینوزا PAO1 با میکروسکوپ

الکترونی (مقیاس اندازه‌گیری ۱۰ میکرومتر)

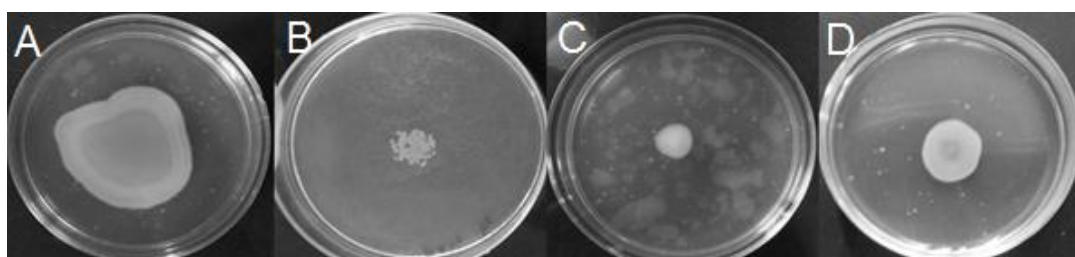
تصویر A، سویه تیمار نشده است که نشان‌دهنده تشکیل کامل بیوفیلم و ارتباط سلول‌های باکتریایی می‌باشد. تصویر B، سویه تیمار شده با اوژنول است که تشکیل بیوفیلم در آن مهار شده است و باکتری‌ها به شکل پراکنده به سطح متصل هستند.



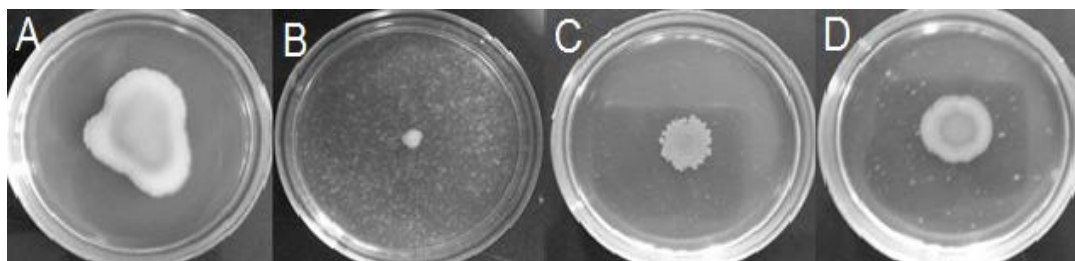
شکل ۶- تصاویر بدست آمده از بیوفیلم تشکیل شده در سطح اسلاید شیشه‌ای سویه سودوموناس آئروژینوزا ATCC ۲۷۸۵۳ با میکروسکوپ الکترونی (مقیاس اندازه‌گیری ۱۰ میکرومتر)
 تصویر A، سویه تیمار نشده است که نشان‌دهنده تشکیل کامل بیوفیلم و ارتباط سلول‌های باکتریایی می‌باشد. تصویر B، سویه تیمار شده با اوژنول است که تشکیل بیوفیلم در آن مهار شده است و باکتری‌ها به شکل پراکنده به سطح متصل هستند.

swarming در تمام سویه‌ها شد، اما تأثیری بر رشد باکتری‌ها نداشت (شکل‌های ۷-۱۱).

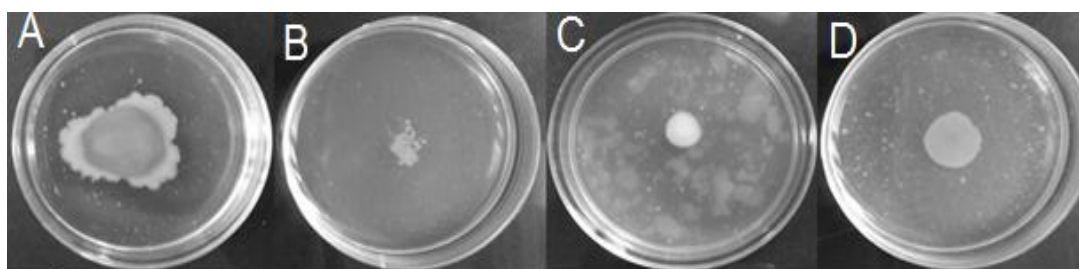
بررسی اثر اوژنول بر حرکت **Swarming** اوژنول در غلظت‌های ≥ 0.15 (v/v)٪ سبب مهار حرکت



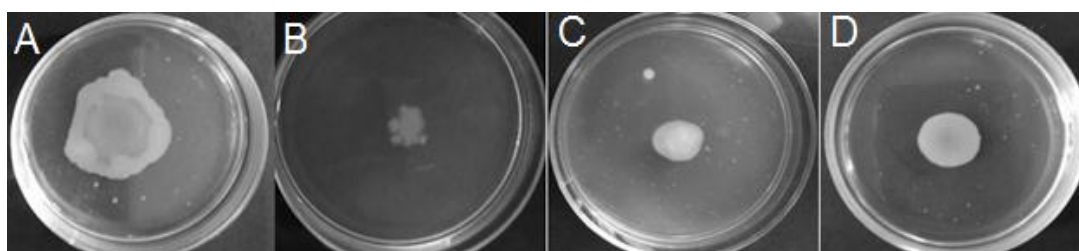
شکل ۷- اثر اوژنول بر حرکت swarming سویه سودوموناس آئروژینوزا PAO1 بعد از ۲۴ ساعت، (A) حرکت swarming بدون تیمار با اوژنول (B, C, D) مهار حرکت swarming به ترتیب در غلظت ۰.۱۵٪، ۰.۰۷۵٪ و ۰.۰۳۷٪ اوژنول



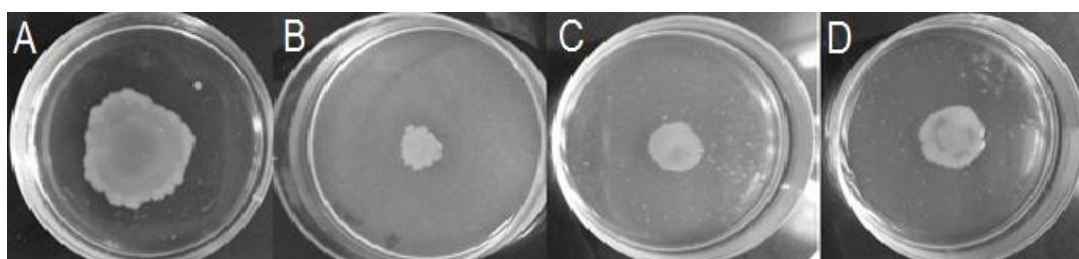
شکل ۸- اثر اوژنول بر حرکت swarming سویه سودوموناس آئروژینوزا ATCC ۲۷۸۵۳ بعد از ۲۴ ساعت، (A) حرکت swarming بدون تیمار با اوژنول (B, C, D) مهار حرکت swarming به ترتیب در غلظت ۰.۱۵٪، ۰.۰۷۵٪ و ۰.۰۳۷٪ اوژنول



شکل ۹- اثر اوژنول بر حرکت swarming سویه سودوموناس آئروژینوزا ۱ بعد از ۲۴ ساعت، (A) حرکت swarming بدون تیمار با اوژنول (B, C, D) مهار حرکت swarming به ترتیب در غلظت ۰/۱۵٪، ۰/۰۷۵٪ و ۰/۰۳۷٪ اوژنول



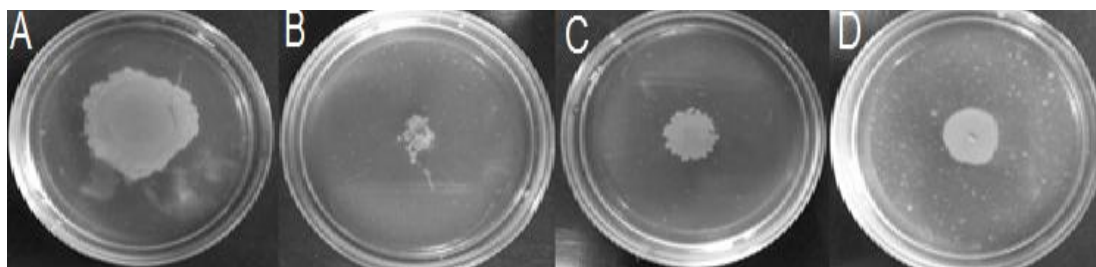
شکل ۱۰- اثر اوژنول بر حرکت swarming سویه سودوموناس آئروژینوزا ۲ بعد از ۲۴ ساعت، (A) حرکت swarming بدون تیمار با اوژنول (B, C, D) مهار حرکت swarming به ترتیب در غلظت ۰/۱۵٪، ۰/۰۷۵٪ و ۰/۰۳۷٪ اوژنول



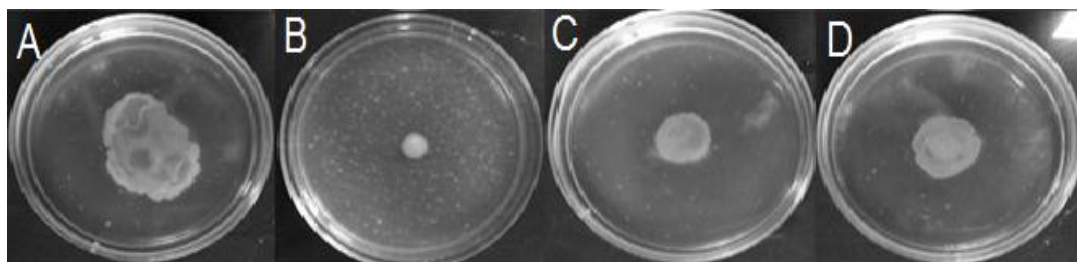
شکل ۱۱- اثر اوژنول بر حرکت swarming سویه سودوموناس آئروژینوزا ۳ بعد از ۲۴ ساعت، (A) حرکت swarming بدون تیمار با اوژنول (B, C, D) مهار حرکت swarming به ترتیب در غلظت ۰/۱۵٪، ۰/۰۷۵٪ و ۰/۰۳۷٪ اوژنول

swimming در تمام سویه‌ها شد، اما تأثیری بر رشد باکتری‌ها نداشت (شکل‌های ۱۶-۱۲).

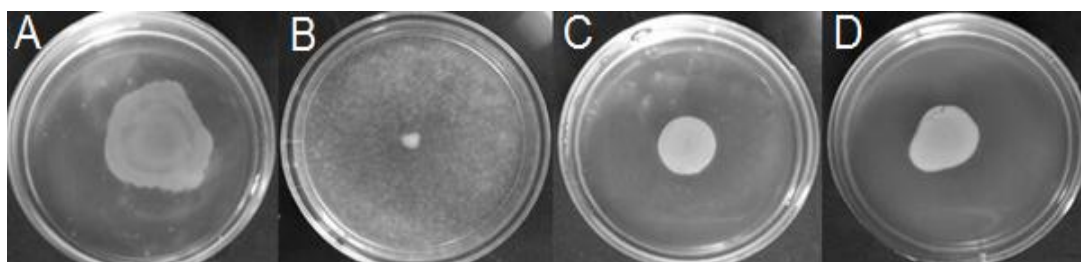
بررسی اثر اوژنول بر حرکت swimming
اوژنول در غلظت‌های $(v/v) \geq 0/15\%$ سبب مهار حرکت



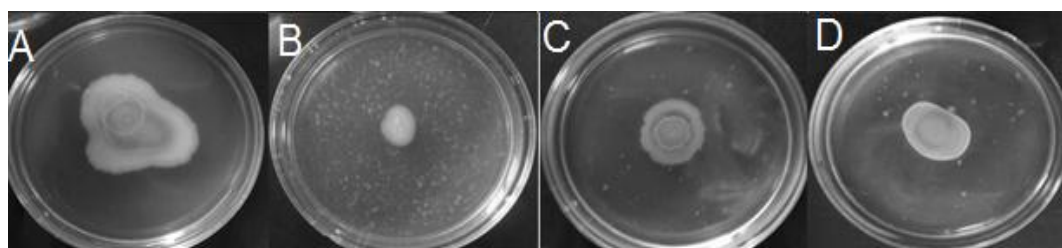
شکل ۱۲- اثر اوژنول بر حرکت swimming سویه سودوموناس آئروژینوزا PA01 بعد از ۲۴ ساعت، (A) حرکت swimming بدون تیمار با اوژنول (B, C, D) مهار حرکت swarming به ترتیب در غلظت ۰/۱۵٪، ۰/۰۷۵٪ و ۰/۰۳۷٪ اوژنول



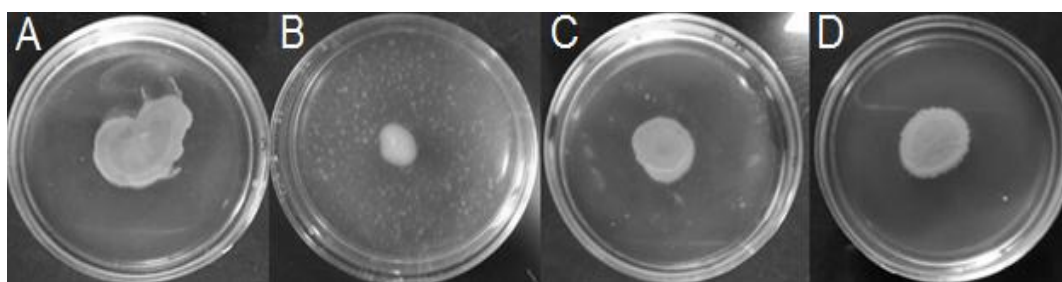
شکل ۱۳- اثر اوژنول بر حرکت swimming سویه سودوموناس آئروژینوزا ATCC ۲۷۸۵۳ بعد از ۲۴ ساعت، (A) حرکت swimming بدون تیمار با اوژنول (B, C, D) مهار حرکت swarming به ترتیب در غلظت ۰/۰۱۵٪، ۰/۰۷۵٪ و ۰/۰۳۷٪ اوژنول



شکل ۱۴- اثر اوژنول بر حرکت swimming سویه سودوموناس آئروژینوزا ۱ بعد از ۲۴ ساعت، (A) حرکت swimming بدون تیمار با اوژنول (B, C, D) مهار حرکت swarming به ترتیب در غلظت ۰/۰۱۵٪، ۰/۰۷۵٪ و ۰/۰۳۷٪ اوژنول



شکل ۱۵- اثر اوژنول بر حرکت swimming سویه سودوموناس آئروژینوزا ۲ بعد از ۲۴ ساعت، (A) حرکت swimming بدون تیمار با اوژنول (B, C, D) مهار حرکت swarming به ترتیب در غلظت ۰/۰۱۵٪، ۰/۰۷۵٪ و ۰/۰۳۷٪ اوژنول

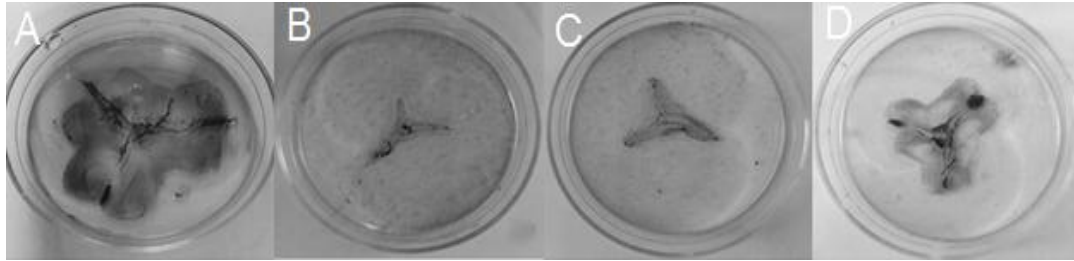


شکل ۱۶- اثر اوژنول بر حرکت swimming سویه سودوموناس آئروژینوزا ۳ بعد از ۲۴ ساعت، (A) حرکت swimming بدون تیمار با اوژنول (B, C, D) مهار حرکت swarming به ترتیب در غلظت ۰/۰۱۵٪، ۰/۰۷۵٪ و ۰/۰۳۷٪ اوژنول

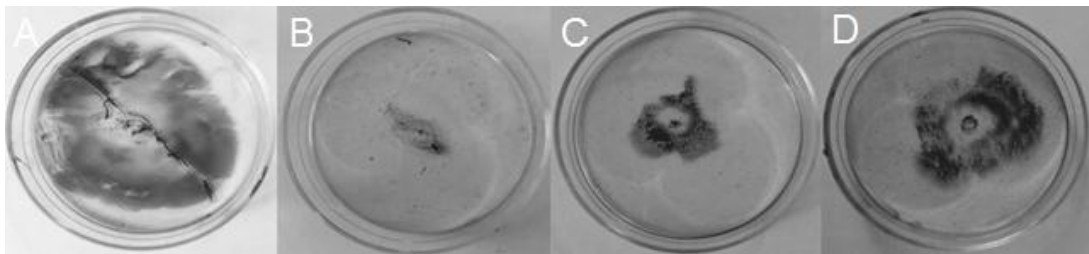
بررسی اثر اوژنول بر حرکت **Twitching**

آزمون نیز اوژنول در غلظت‌های (v/v) $\geq 0.15\%$ سبب مهار حرکت در تمام سویه‌ها شد، اما تأثیری بر رشد باکتری‌ها نداشت.

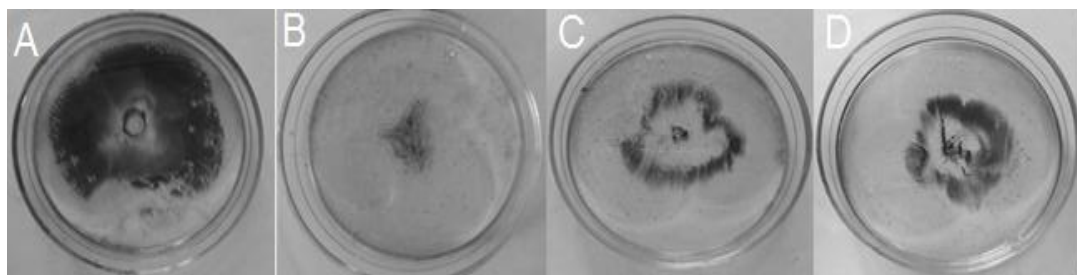
همانطور که در شکل‌های ۱۷-۲۱ مشخص است، در این



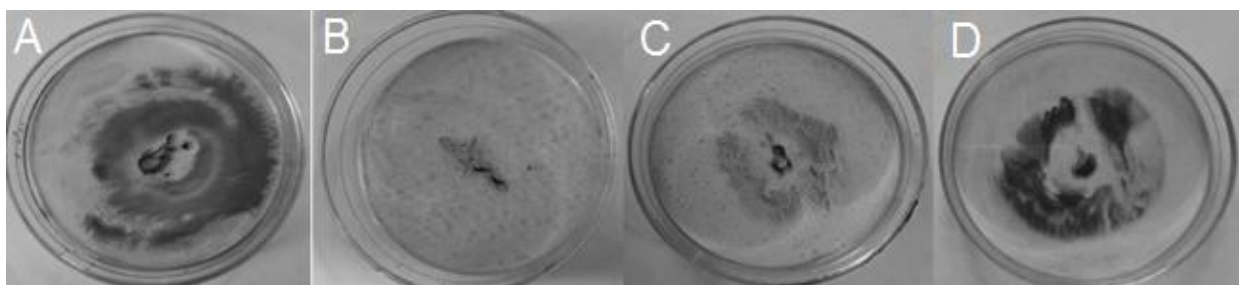
شکل ۱۷- تأثیر اوژنول بر حرکت **twitching** سویه سودوموناس آئروژینوزا PAO1 بعد از ۲۴ ساعت، (A) حرکت **twitching** بدون تیمار با اوژنول (B, C, D) مهار حرکت **twitching** به ترتیب در غلظت 0.15% ، 0.075% و 0.037% اوژنول



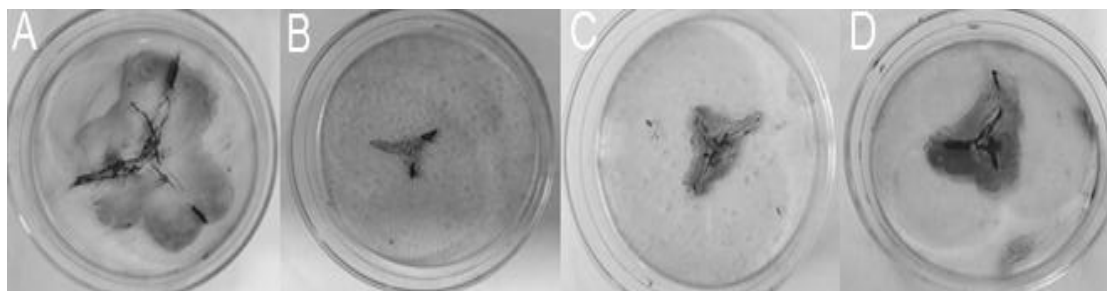
شکل ۱۸- تأثیر اوژنول بر حرکت **twitching** سویه سودوموناس آئروژینوزا ATCC ۲۷۸۵۳ بعد از ۲۴ ساعت، (A) حرکت **twitching** بدون تیمار با اوژنول (B, C, D) مهار حرکت **twitching** به ترتیب در غلظت 0.15% ، 0.075% و 0.037% اوژنول



شکل ۱۹- تأثیر اوژنول بر حرکت **twitching** سویه سودوموناس آئروژینوزا ۱ بعد از ۲۴ ساعت، (A) حرکت **twitching** بدون تیمار با اوژنول (B, C, D) مهار حرکت **twitching** به ترتیب در غلظت 0.15% ، 0.075% و 0.037% اوژنول



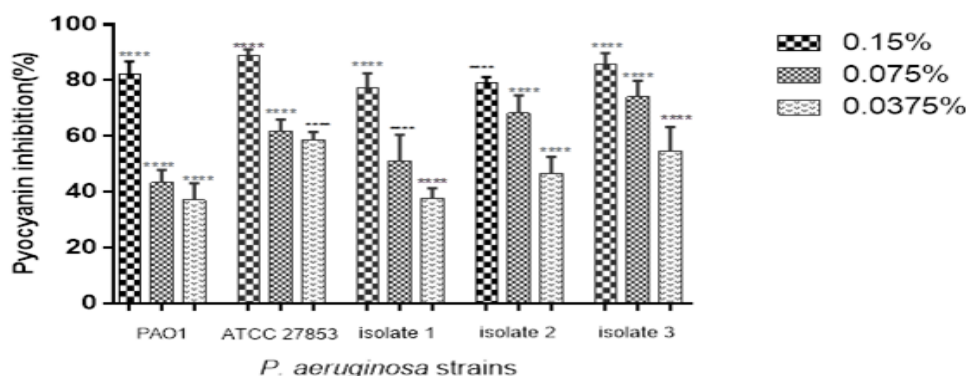
شکل ۲۰- تأثیر اوژنول بر حرکت **twitching** سویه سودوموناس آئروژینوزا ۲ بعد از ۲۴ ساعت، (A) حرکت **twitching** بدون تیمار با اوژنول (B, C, D) مهار حرکت **twitching** به ترتیب در غلظت 0.15% ، 0.075% و 0.037% اوژنول



شکل ۲۱- تأثیر اوژنول بر حرکت twitching سویه سودوموناس آئروژینوزا ۳ بعد از ۲۴ ساعت، (A) حرکت twitching بدون تیمار با اوژنول (B, C, D) مهار حرکت twitching به ترتیب در غلظت ۰/۰۱۵٪، ۰/۰۷۵٪ و ۰/۰۳۷٪ اوژنول

معنی داری ($P < 0.05$) را در تولید پیوسیانین در نمونه‌های تیمار شده با اوژنول، در مقایسه با گروه شاهد نشان دادند (شکل ۲۲).

بررسی اثر اوژنول بر میزان تولید پیوسیانین مقادیر جذب نوری نمونه‌های شاهد و تیمار شده با اوژنول در ۵۴۵ نانومتر خوانده شد. نتایج کاهش



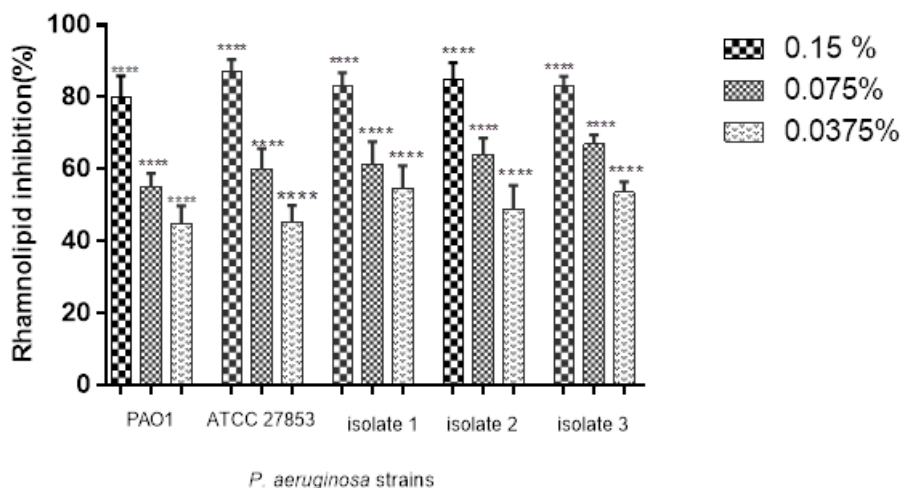
شکل ۲۲- درصد مهار تولید پیوسیانین در سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا در تیمار با اوژنول پس از ۷۲ ساعت ($*P < 0.05$, $**P < 0.005$, $***P < 0.0005$, $****P < 0.0001$)

اثر مولکول‌های پیام‌رسان تولیدی از سودوموناس آئروژینوزا بر سیستم QS باکتری *C. violaceum* (CV026) در حضور و عدم حضور اوژنول به منظور بررسی حضور مولکول‌های پیام‌رسان وابسته به QS، از باکتری نشانگر *C. violaceum* (CV026) استفاده شد. مشاهده شد که در نمونه‌های تیمار نشده سودوموناس آئروژینوزا PAO1 و سودوموناس آئروژینوزا ۲۷۸۵۳ ATCC، مولکول‌های پیام‌رسان ترشح شده از سودوموناس آئروژینوزا منجر به تحریک سیستم *C. violaceum* QS

بررسی اثر اوژنول بر تولید رامنولیپید در این آزمایش قطر هاله تشکیل رامنولیپید در پلیت‌های حاوی اوژنول و فاقد اوژنول اندازه‌گیری و با UV transilluminator در طول موج ۳۶۵ نانومتر عکس برداری شد. میزان تولید رامنولیپید در سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا PAO1، ۲۷۸۵۳ ATCC و سه جدایه بالینی در حضور غلظت‌های مختلف اوژنول در مقایسه با نمونه تیمار نشده به طور معنی‌داری کاهش یافته بود ($P < 0.05$) (شکل ۲۳).

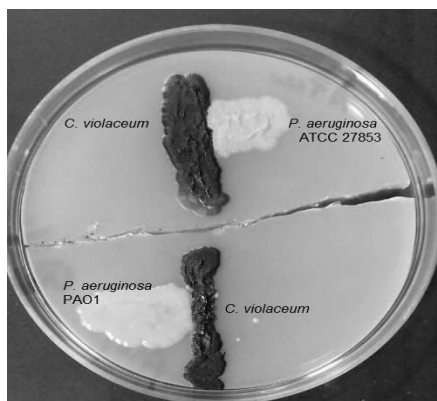
غلظت‌های ذکر شده، منجر به تولید ویولاستین در *C. violaceum* نشد (در روش ایجاد چاهک) (شکل‌های ۲۵ و ۲۶).

violaceum و ترشح پیگمان ویولاستین در روش کشت متقاطع شدند (شکل ۲۴). در حالی‌که مجاورت همزمان سوپرناتانت کشت سودوموناس آئروژینوزا با اوژنول در



شکل ۲۳- درصد مهار تولید رامنولپید در سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا در تیمار با اوژنول پس از ۷۲ ساعت

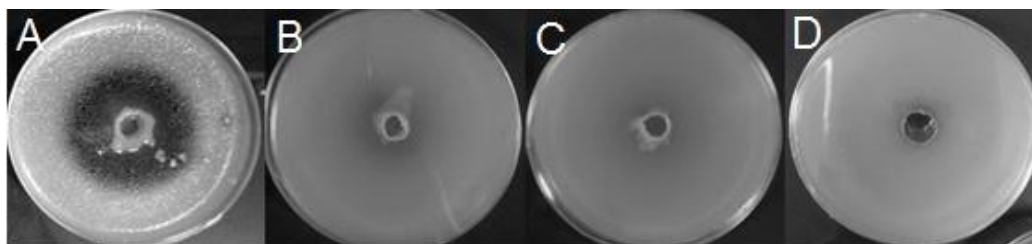
(* $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.0005$, **** $P < 0.0001$)



شکل ۲۴- سویه سودوموناس آئروژینوزا PAO1 و ATCC ۲۷۸۵۳ در مجاورت سویه *C. violaceum* CV026

به شکل کشت متقاطع

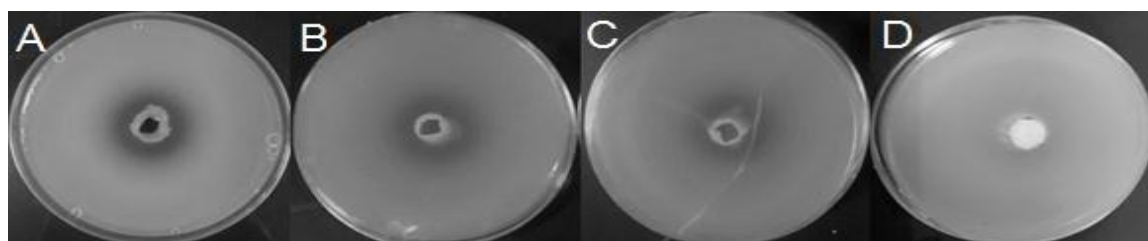
مولکول‌های پیام‌رسان ترشحی از سودوموناس آئروژینوزا منجر به تحریک سیستم QS *C. violaceum* CV026 و تولید رنگدانه بنفش ویولاستین شدند.



شکل ۲۵- بررسی تأثیر مجاورت سوپرناتانت سویه سودوموناس آئروژینوزا PAO1 و اوژنول بر سیستم QS و تولید رنگدانه ویولاستین *C. violaceum* پس از ۴۸ ساعت، (A) سویه *C. violaceum* CV026 به همراه تلقیح سوپرناتانت سودوموناس آئروژینوزا

PAO1 در چاهک بدون حضور اوژنول

مولکول‌های پیام‌رسان ترشح شده از سودوموناس آئروژینوزا PAO1 باعث تحریک سیستم QS *C. violaceum* CV026 و تولید پیگمان ویولاستین شدند. (D, C, B) عدم تولید رنگدانه *C. violaceum* CV026 در حضور سوپرناتانت سودوموناس آئروژینوزا PAO1 و اوژنول در غلظت‌های به ترتیب ۰٪/۱۵، ۰٪/۰۷۵ و ۰٪/۰۳۷



شکل ۲۶- بررسی تأثیر مجاورت سوپرناتانت سویه سودوموناس آئروژینوزا ATCC ۲۷۸۵۳ و اوژنول بر سیستم QS و تولید رنگدانه ویولاستین *C. violaceum* پس از ۴۸ ساعت، (A) سویه *C. violaceum* CV026 به همراه تلقیح سوپرناتانت سودوموناس آئروژینوزا

ATCC ۲۷۸۵۳ در چاهک بدون حضور اوژنول

مولکول‌های پیام‌رسان ترشح شده از سودوموناس آئروژینوزا ATCC ۲۷۸۵۳ باعث تحریک سیستم QS *C. violaceum* CV026 و تولید پیگمان ویولاستین شدند. (D, C, B) عدم تولید رنگدانه *C. violaceum* CV026 در حضور سوپرناتانت سودوموناس آئروژینوزا ATCC ۲۷۸۵۳ و اوژنول در غلظت‌های به ترتیب ۰٪/۱۵، ۰٪/۰۷۵ و ۰٪/۰۳۷

بحث

تأثیری بر رشد میکروارگانیسم‌ها نداشتند، برای ارزیابی عوامل بیماری‌زای پیوسیانین، رامنولیبید، حرکت، تولید آگزوپلی ساکارید و تشکیل بیوفیلم استفاده شد. همه این عوامل بیماری‌زا در ۳ غلظت مورد استفاده اوژنول در سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا ATCC ۲۷۸۵۳، سودوموناس آئروژینوزا PAO1 و سه سویه بالینی مهار شدند.

یکی از دلایل عفونت مزمن سودوموناس آئروژینوزا در بیماران مبتلا به فیروز سیستمیک، انتخاب سویه‌های جهش یافته موکوئید و مولد پلی ساکارید خارج سلولی آلرژینات است. این باکتری‌ها قادرند در بیوفیلم رشد کنند که به‌عنوان یک راهبرد برای بقا در این باکتری است. زیرا ماتریکس احاطه کننده

افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی سودوموناس آئروژینوزا منجر به جستجوی روش‌های درمانی جدید شده است. مهارکننده‌های سیستم QS بدون اثر بر رشد باکتری بیماری‌زا، سبب کاهش بیماری‌زایی می‌شوند. بنابراین رویکردهای درمانی جدیدی که سیستم QS را مورد هدف قرار دهند اهمیت دارند. در این مطالعه، منحنی رشد سودوموناس آئروژینوزا در حضور MIC و MBC اوژنول تغییر کرد و این مطلب نشان داد که این ماده دارای اثر باکتری‌کشی و باکتریواستاتیکی بر روی باکتری‌هاست. از این رو برای انجام سایر آزمون‌ها از غلظت‌های ۰٪/۱۵، ۰٪/۰۷۵ و ۰٪/۰۳۷ (حجمی/حجمی) اوژنول که

سلول‌های B. تولید پیوسیانین عمدتاً توسط سیستم‌های pqs و rhl تنظیم می‌شود؛ پیوسیانین در تشکیل میکروکلونی و افزایش تراکم سلولی برای تشکیل بیوفیلم سودوموناس آئروژینوزا نقش دارد و به این ترتیب سبب مزمن شدن عفونت‌های ریوی می‌شود (Kanthakumar et al., Hassett et al., 1992). در مطالعه ما، کاهش در تولید پیوسیانین همراه با کاهش در تشکیل و بلوغ بیوفیلم بود که کاهش در بیماری‌زایی سودوموناس آئروژینوزا را به دنبال داشت. طبق مشاهدات ما، ممانعت از تشکیل بیوفیلم و تولید آگزوبیلی‌ساکارید همراه با کاهش تولید پیوسیانین است که به علت حضور اوژنول اتفاق افتاده است. از آنجایی که اوژنول از حرکت و تشکیل بیوفیلم باکتری به همراه تولید پیگمان پیوسیانین ممانعت کرده است، می‌تواند به‌عنوان یک کاندیدای بسیار خوب برای تضعیف عوامل بیماری‌زایی سودوموناس باشد.

از آنجایی که سیستم QS، حرکت را در باکتری‌های گرم منفی کنترل می‌کند و این عامل نقش مهمی در کلونیزاسیون و تشکیل بیوفیلم دارد، از این‌رو اثر اوژنول بر روی این ویژگی نیز ارزیابی شد. حرکت swimming و swarming در سودوموناس آئروژینوزا با کمک فلاژل و حرکت twitching با پیلی تایپ IV انجام می‌شود. هر ۳ حرکت در تشکیل بیوفیلم نقش دارند و توسط سیستم rhl، las، pqs کنترل می‌شوند (Köhler et al., 2000). در این مطالعه، اوژنول در غلظت‌های پایین‌تر از MIC منجر به کاهش هر ۳ نوع حرکت شد. بنابراین این نتایج می‌توانند نشانگر اثر اوژنول در ایجاد اختلال در سیستم QS و یا تداخل در پیلی‌تایپ IV و فلاژل باشند که به دنبال آن کاهش در تشکیل بیوفیلم مشاهده می‌شود. در این مطالعه، کاهش حرکت Swarming به همراه ممانعت از تشکیل بیوفیلم پیشنهاد می‌کند که اوژنول نه تنها در مراحل اولیه تشکیل بیوفیلم مؤثر است، بلکه می‌تواند طراحی ساختار بیوفیلم را نیز تحت تأثیر قرار دهد.

رامنولیبیدها در حرکت Swarming باکتری، تعاملات سلولی، تمایزات سلولی و تشکیل کانال‌های آبی در بیوفیلم سودوموناس آئروژینوزا نقش دارند. بیوستز رامنولیبید توسط سیستم rhl تنظیم می‌شود. رامنولیبید سلول‌های اپی‌تلیال را

بیوفیلم‌ها، باکتری‌ها را از فاگوسیت‌ها و فعالیت سیستم کمپلمان حفاظت می‌کند. سودوموناس آئروژینوزا رشد کرده در چنین ماتریکسی به آنتی‌بیوتیک‌ها و ضدعفونی‌کننده‌ها مقاوم است (Van Delden & Iglewski, 1998). البته استفاده از مهارکننده‌های QS در درمان عفونت‌های حاصل از تشکیل بیوفیلم در حال گسترش است. در این مطالعه، اوژنول در غلظت‌های استفاده شده، تشکیل بیوفیلم را در تمام سویه‌ها مهار کرد. همچنین تصاویر میکروسکوپ الکترونی نشان داد که در بیوفیلم تیمار شده با اوژنول، تعداد کمتری سلول چسبیده به سطح در مقایسه با گروه شاهد وجود دارد و ساختار بیوفیلم از دست رفته است. از این‌رو این احتمال وجود دارد که در بالین، اوژنول بتواند ارگانیسیم را حساس کند و راهی برای اثر آنتی‌بیوتیک‌ها در سلول‌های حساس شده، باز کند. در عین حال به سیستم دفاعی میزبان اجازه دهد تا به شکل موفق باکتری‌ها را پاکسازی کند.

از آنجا که سیستم QS، تولید آگزوبیلی‌ساکارید را در باکتری‌های گرم منفی کنترل می‌کند و نقش مهمی در تشکیل بیوفیلم دارد، از این‌رو اثر اوژنول بر میزان تولید آگزوبیلی‌ساکارید نیز بررسی شد. در این مطالعه، کاهش معنی‌داری در تولید آگزوبیلی‌ساکارید سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا ۲۷۸۵۳ ATCC و PAO1 و سویه‌های بالینی در غلظت‌های مختلف اوژنول در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد.

نتایج مطالعه ما، کاهش چشمگیری در تولید پیوسیانین سویه‌های مورد نظر در تیمار با اوژنول نشان داد. پیگمان پیوسیانین، یک متابولیت ثانویه و از اعضای خانواده بزرگ از ترکیب‌های سه حلقه‌ای به نام فنازین و یک ترکیب حل‌شونده در کلروفرم با نام کامل 1-hydroxy-5-methyl-phenazine است. این پیگمان در توانایی باکتری برای پایداری در ریه افراد مبتلا به فیبروز سیستیک نقش دارد. پیوسیانین در بسیاری از اعمال سلول‌های پستانداران دخالت می‌کند که از جمله آنها می‌توان به موارد زیر اشاره کرد: تنفس سلولی، زنش مژک‌های تنفسی، رشد سلول‌های اپی‌درمال، اختلال در هومئوستازی کلسیم، ایجاد آپوپتوز در نوتروفیل‌ها، آزاد شدن IL-2 (که رشد نفوسیت‌ها را محدود می‌کند) و ترشح ایمونوگلوبولین‌ها توسط

داروهای جایگزینی برای درمان عفونت‌های باکتریایی فراهم می‌کنند و در عین حال منجر به مقاومت آنتی‌بیوتیکی هم نمی‌شوند. اوژنول در صنایع غذایی استفاده می‌شود و کاربردهای درمانی فراوانی دارد. یافته‌های این مطالعه نشان داد که اوژنول به‌طور معنی‌داری منجر به کاهش تولید عوامل بیماری‌زای سودوموناس *آئروژینوزا* از جمله تولید پایوسیانین و رامنولیبید می‌شود. همچنین این ترکیب می‌تواند تشکیل بیوفیلم، تولید آگزوپلی‌ساکارید و حرکت باکتری را مهار کند. بنابراین می‌توان از اوژنول یا مولکول‌های مشابه آن در آینده به‌عنوان مدلی برای مداخله با سیستم QS باکتریایی و مقابله با بیماری‌زایی باکتری‌ها استفاده کرد.

سپاسگزاری

این کار با حمایت مالی دانشگاه تهران انجام شده است، بنابراین از مدیران و دست‌اندرکاران قدردانی می‌شود.

منابع مورد استفاده

- Al-Adham, I.S.I., Khalil, E., Al-Hmoud, N.D., Kierans, M. and Collier, P.J., 2000. Microemulsions are membrane-active, antimicrobial, self-preserving systems. *Journal of Applied Microbiology*, 82: 32-39.
- Bhat, R., Dayamani, K.J., Hathwar, S., Hegde, R. and Kush, A., 2015. Exploration on production of rhamnolipid biosurfactants using native *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Journal of BioScience & Biotechnology*, 4(2): 157-166.
- Chatterjee, M., D'Morris, S., Paul, V., Warriar, S., Vasudevan, A.K., Vanuopadath, M., Nair, S.S., Paul-Prasanth, B., Mohan, C.G. and Biswas, R., 2017. Mechanistic understanding of phenyllactic acid mediated inhibition of quorum sensing and biofilm development in *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 101(22): 8223-8236.
- Gowrishankar, S., Poornima, B. and Pandian, S.K., 2014. Inhibitory efficacy of cyclo (l-leucyl-l-prolyl) from mangrove rhizosphere bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* (MMS-50) toward cariogenic properties of *Streptococcus mutans*. *Research in Microbiology*, 165(4): 278-289.
- Hassett, D.J., Charniga, L., Bean, K., Ohman, D.E. and Cohen, M.S., 1992. Response of *Pseudomonas aeruginosa* to pyocyanin: mechanisms of resistance,

هدف قرار داده و به پنهان شدن باکتری در برابر فاگوسیت‌کننده‌ها کمک می‌کند (Bhat *et al.*, 2015). نتایج ما کاهش در تولید رامنولیبید را در غلظت‌های پایین‌تر از MIC در تمام سویه‌های مورد آزمون در مقایسه با گروه کنترل نشان داد.

برای بررسی حضور مولکول‌های پیام‌رسان تولید شده توسط سودوموناس *آئروژینوزا* ۲۷۸۵۳ ATCC و PAO1، از باکتری نشانگر *Chromobacterium violaceum* (CV026) استفاده شد. سودوموناس *آئروژینوزا* ۲۷۸۵۳ ATCC و سودوموناس *آئروژینوزا* PAO1 منجر به تحریک QS CV026 *C. violaceum* و تولید رنگدانه بنفش ویولاستین شدند. در حالی که سوپرناونت کشت آنها در مجاورت با اوژنول، مانع تحریک سیستم QS در *C. violaceum* CV026 و عدم تولید ویولاستین شد. سازوکار فعالیت ترکیب‌های ضد QS بر روی سیستم QS، پدیده‌ای پیچیده است. بنابراین به نظر می‌رسد که ترکیب‌های ضد QS حاوی مولکول‌هایی هستند که از ساختار مولکول‌های پیام‌رسان و یا عملکرد آنها تقلید می‌کنند و یا ترکیب‌هایی دارند که برای مولکول‌های پیام‌رسان آنتاگونیست هستند. به‌علاوه این ترکیب‌ها می‌توانند به شکل بالقوه با سایر بخش‌های سیستم QS (همانند پروتئین تنظیم‌کننده یا آنزیم سنتزکننده مولکول‌های پیام‌رسان) تداخل ایجاد کنند (Vasavi *et al.*, 2013). اوژنول به شکل رقابتی با مولکول‌های پیام‌رسان به رسپتور QS متصل می‌شود و در نهایت منجر به مهار ژن‌های مرتبط با QS می‌شود (Rathinam *et al.*, 2017).

اخیراً مطالعات مشابهی در این زمینه انجام شده است (Srinivasan *et al.*, Rathinam & Viswanathan, 2018)؛ از آن جمله، در سال ۲۰۱۹ تحقیقی توسط محققان چینی انجام شد. این محققان نیز دریافتند که اوژنول و نانو امولسیون آن می‌توانند تولید پایوسیانین و رامنولیبید را در سودوموناس کاهش دهند و موجب ممانعت از تشکیل بیوفیلم و حرکت این باکتری شوند. این کاهش وابسته به غلظت اوژنول است (Lou *et al.*, 2019).

به‌عنوان نتیجه‌گیری کلی باید گفت که محصولات طبیعی،

- Rathinam, P. and Viswanathan, P., 2018. Anti-virulence potential of eugenol-rich fraction of *Syzygium aromaticum* against multidrug resistant uropathogens isolated from catheterized patients. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 8(5): 416-431.
- Roche, D.M., Byers, J.T., Smith, D.S., Glansdorp, F.G., Spring, D.R. and Welch, M., 2004. Communications blackout? Do N-acylhomoserine-lactone-degrading enzymes have any role in quorum sensing? *Microbiology*, 150(7): 2023-2028.
- Sobieszcańska, N., Myszka, K., Szwengiel, A., Majcher, M., Grygier, A. and Wolko, Ł., 2020. Tarragon essential oil as a source of bioactive compounds with anti-quorum sensing and anti-proteolytic activity against *Pseudomonas* spp. isolated from fish- in vitro, in silico and in situ approaches. *International Journal of Food Microbiology*, 331: 108732.
- Srinivasan, R., Devi, K.R., Kannappan, A., Pandian, S.K. and Ravi, A.V., 2016. Piper betle and its bioactive metabolite phytol mitigates quorum sensing mediated virulence factors and biofilm of nosocomial pathogen *Serratia marcescens* in vitro. *Journal of Ethnopharmacology*, 193: 592-603.
- Van Delden, C. and Iglewski, B.H., 1998. Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerging Infectious Diseases*, 4(4): 551-560.
- Vasavi, H.S., Arun, A.B. and Rekha, P.D., 2013. Inhibition of quorum sensing in *Chromobacterium violaceum* by *Syzygium cumini* L. and *Pimenta dioica* L. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 3(12):954-459.
- Williams, P., Camara, M., Hardman, A., Swift, S., Milton, D., Hope, V.J. and Bycroft, B.W., 2000. Quorum sensing and the population-dependent control of virulence. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 355(1397): 667-680.
- Yogalakshmi, B., Viswanathan, P. and Anuradha, C.V. 2010. Investigation of antioxidant, anti-inflammatory and DNA-protective properties of eugenol in thioacetamide-induced liver injury in rats. *Toxicology*, 268(3): 204-212.
- Zhang, Y., Wang, Y., Zhu, X., Cao, P., Wei, S. and Lu, Y., 2017. Antibacterial and antibiofilm activities of eugenol from essential oil of *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M. Perry (clove) leaf against periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *Microbial Pathogenesis*, 113: 396-402.
- Zhou, L., Zheng, H., Tang, Y., Yu, W. and Gong, Q., 2013. Eugenol inhibits quorum sensing at sub-inhibitory concentrations. *Biotechnology letters*, 35(4): 631-637.
- antioxidant defenses, and demonstration of a manganese-cofactored superoxide dismutase. *Infection and Immunity*, 60(2): 328-336.
- Husain, F.M., Ahmad, I., Asif, M. and Tahseen, Q., 2013. Influence of clove oil on certain quorum-sensing-regulated functions and biofilm of *Pseudomonas aeruginosa* and *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Biosciences*, 38(5): 835-844.
- Kanthakumar, K., Taylor, G., Tsang, K.W., Cundell, D.R., Rutman, A., Smith, S. and Wilson, R., 1993. Mechanisms of action of *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin on human ciliary beat in vitro. *Infection and Immunity*, 61(7): 2848-2853.
- Kim, Y.G., Lee, J.H., Kim, S.I., Baek, K.H. and Lee, J., 2015. Cinnamon bark oil and its components inhibit biofilm formation and toxin production. *International Journal of Food Microbiology*, 195: 30-39.
- Köhler, T., Curty, L.K., Barja, F., Van Delden, C. and Pechère, J.C., 2000. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *Journal of Bacteriology*, 182(21): 5990-5996.
- Lou, Z., Letsididi, K.S., Yu, F., Pei, Z., Wang, H. and Letsididi, R., 2019. Inhibitive effect of eugenol and its nanoemulsion on quorum sensing-mediated virulence factors and biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Food Protection*, 82(3): 379-389.
- Madigan, M.T., Clark, D.P., Stahl, D. and Martinko, J.M., 2010. *Brock Biology of Micro organisms*. Benjamin Cummings, San Francisco, 1152p.
- Mahapatra, S.K. and Roy, S., 2014. Phytopharmacological approach of free radical scavenging and anti-oxidative potential of eugenol and *Ocimum gratissimum* Linn. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 7: S391-S397.
- O'Neill, E., Pozzi, C., Houston, P., Smyth, D., Humphreys, H., Robinson, D.A. and O'Gara, J.P. 2007. Association between methicillin susceptibility and biofilm regulation in *Staphylococcus aureus* isolates from device-related infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(5): 1379-1388.
- Rashid, M.H. and Kornberg, A., 2000. Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(9): 4885-4890.
- Rathinam, P., Vijay Kumar, H.S. and Viswanathan, P., 2017. Eugenol exhibits anti-virulence properties by competitively binding to quorum sensing receptors. *Biofouling*, 33(8): 624-639.

Eugenol: a potent quorum sensing inhibitor to restrict *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity

S. Moslemi¹ and N. Kashef^{2*}

1- M.Sc. in Microbiology, Department of Microbiology, School of Biology, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran

2*- Corresponding author, Department of Microbiology, School of Biology, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran
E-mail: kashefn@khayam.ut.ac.ir

Received: March 2020

Revised: August 2020

Accepted: October 2020

Abstract

Bacterium *Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic human pathogen and one of the most important causes of nosocomial infections in a wide range of immunocompromised patients including those with malignancies, cystic fibrosis, and burns. This bacterium produces many virulence factors and is highly resistant to lots of common antibiotics due to its biofilm formation. The production of many virulence factors in this bacterium is under the control of quorum sensing systems (QS). The QS is an attractive target for the development of novel therapeutics. Eugenol is the major component of clove (*Eugenia caryophyllata*) oil. The previous studies have shown its antibacterial activities. This study aimed to determine the *in vitro* anti-QS activity of eugenol on QS-regulated biofilm formation and virulence factors production in *P. aeruginosa* strains. The minimum inhibitory concentration (MIC) of eugenol was determined against two strains of this bacterium ATCC 27853 and PAO1, and three clinical isolates. Then the effect of eugenol on bacterial proliferation was determined by monitoring the growth curve. The biofilm formation, the production of exopolysaccharide (EPS), pyocyanins, rhamnolipids, the motility of swimming, swarming, and twitching were evaluated after the eugenol treatment. The MICs against two strains of the bacterium ATCC 27853 and PAO1 were obtained 0.3% and 0.6% (v/v), respectively. Different concentrations of eugenol ($\leq 0.15\%$) significantly reduced the production of virulence factors including pyocyanin and rhamnolipid. The biofilm formation, EPS production, and swarming, swimming, and twitching motility were also reduced after the eugenol treatment. In general, according to the results of this study, the use of eugenol, as a potent QS inhibitor and anti-biofilm agent, could be an effective therapeutic strategy against *P. aeruginosa* infections.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, antibiotic resistance, virulence factors, Quorum Sensing, essential oils.