مقاله تحقیقی

مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره هفدهم، شماره ۱، دی ۱۳۹۳، صفحه ۸۴-۷۷

مقایسه اثر ضدمیکروبی عصاره‌های الکلی گیاه انار بر فرم منفرد و بیوفیلمی شش باکتری پاتوژن

زینب محسنی پور (MSc)[۱]، مهدی حسن شاهیان (PhD)[۱*]

۱- بخش زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان

دریافت: ۹۳/۲/۱، اصلاح:۹۳/۲/۲۴، پذیرش:۹۳/۴/۴

خلاصه

سابقه و هدف: در طب سنتی از میوه انار برای برخی از بیماریها استفاده می شود. این مطالعه خواص ضد میکروبی عصاره های پوست انار بر فرم منفرد و بیوفیلمی شش باکتری پاتوژن بررسی گردید.

مواد و روشها: اثر بخشی عصاره‌ها بر فرم منفرد با آزمون انتشار دیسک تعیین گردید. مقادیر حداقل مهارکنندگی با غلظت ۰/۰۲ mg/ml و مقادیر حداکثر مهار کنندگی با غلظت ۵۰ mg/ml به روش ماکروبراث دایلوشن محاسبه شد. اثرات ضدبیوفیلمی در سه غلظت ۵ mg/ml، ۱۰ mg/ml و ۲۰ mg/ml با روش میکروتیتر پلیت بررسی گردید. سه شاخص میزان تشکیل بیوفیلم، تخریب بیوفیلم و فعالیت آنزیم دهیدروژناز با روش رنگ آمیزی کریستال ویوله تعیین گردید.

یافته‌ها: دیسک‌های آغشته به عصاره‌های پوست انار رشد باکتری‌های مورد بررسی را حداقل ۵۰ درصد مهار کردند اما بر استرپتوکوکوس پنومونیه، پسودوموناس آئروژینوزا و کلبسیلا پنومونیه بی‌اثر بودند. بر خلاف این در محیط مایع آزمون MIC عصاره‌های مذکور رشد تمامی باکتری‌ها را به خوبی مهار کردند (۷۰ ٪). این عصاره ها ساختار های بیوفیلمی را حداقل به میزان ۵۰ درصد و حداکثر ۹۵ درصد از بین بردند. اثر مهاری عصاره به غلظت و نوع حلال آن وابسته است. بیشترین اثر مهاری در پدیده تشکیل بیوفیلم بر باکتری استافیلوکوکوس ارئوس (۹۵/۸۴٪) بوده و پسودوموناس آئروژینوزا (۵۱/۴۸ ٪) بیشترین تخریب را در تیمار با عصاره‌های این گیاه نشان داد. بالاترین مهار فعالیت متابولیکی نیز در باسیلوس سرئوس (۷۷/۱۳٪) مشاهده گردید.

نتیجه گیری: در این بررسی قابلیت مهاری عصاره‌های پوست انار در مهار فرم منفرد و بیوفیلمی که وابسته به غلظت عصاره و حلال انتخابی است، تایید شد.

واژه های کلیدی: بیوفیلم، گیاه انار، باکتری پاتوژن، مقاومت دارویی، اثر ضدمیکروبی.

مقدمه

مقاومت یک میکروارگانیسم به ترکیبات ضد میکروبی دلایل مختلفی دارد که قرارگیری در ساختاری به نام بیوفیلم یکی از مهم ترین علل آن محسوب می‌شود. بیوفیلم ها اجتماعات سازمان یافته ای از سلول های میکروبی محصور در ماتریکسی از پلیمر های خارج سلولی اند که بر هر سطح در تماس با رطوبت می‌توانند تشکیل شوند (۱). گسترش بیوفیلم‌ها بر سطح تجهیزات پزشکی و صنعتی مشکلات بسیاری را به دنبال دارد. میکروارگانیسم‌های مولد بیوفیلم عامل بیش از ۶۰ درصد عفونت‌های انسانی می‌باشند که این خود درمان بیماری‌های عفونی را دشوارتر می‌نماید. از این‌رو دستیابی به روش‌های نوین و موثر در مقابله با این ساختارهای میکروبی ضروری است (۲). امروزه توجه به ترکیبات زیستی و به ویژه مشتقات گیاهی در مقابله با میکروارگانیسم‌های پاتوژن افزایش یافته است. سابقه مصرف طولانی مدت گیاهان در طب سنتی، ماهیت طبیعی، دسترسی ساده و کم هزینه، عدم بروز مشکلات زیست محیطی و مقبولیت عام بهره‌گیری از گیاهان دارویی؛ همه مزایایی هستند که این ترکیبات زیستی را به گزینه‌های مورد توجه در مطالعات انجام شده به منظور مهار سویه‌های میکروبی تبدیل نموده است (۴و۳). گیاه انار با نام علمی Punica granatum و متعلق به خانواده Punic-aceae می‌باشد. در طب سنتی از میوه انار به منظور برطرف نمودن نارسائی‌های کبدی، سرفه‌های خشک، جوش‌های صورت، خارش پوست و درمان یرقان استفاده می‌شود. پوست انار نیز برای درمان گلودرد، کرم‌های دستگاه گوارشی و اسهال مفید می‌باشد (۶و۵). در بررسی‌های مختلف مشخص شده که عصاره‌های انار حاوی مقادیر زیادی از آنتوسیانیدین‌هایی نظیر سیانیدین و دلفینیدین (Deiphinidin)، اسیدهای فنلی مانند کافئیک اسید و کلروژنیک اسید، تانن‌ها مثل گالیک اسید و الاجیک اسید، فلاون‌ها مانند لوتئولین (Luteolin) و

▣ این مقاله حاصل پایان نامه زینب محسنی پور دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی دانشگاه شهید باهنر کرمان می باشد.

* مسئول مقاله: دکتر مهدی حسن شاهیان
آدرس: کرمان، دانشگاه شهید باهنر کرمان، دانشکده علوم، بخش زیست شناسی. تلفن: ۳۳۲۲۲۰۳۲-۰۳۴
E-mail: mshahi@uk.ac.ir

[DOR: 20.1001.1.15614107.1393.17.1.10.3]
[DOI: 10.22088/jbums.17.1.77]

کوئرستین (Quercetin)، کامپفرول (Kaempferol)، ۱۷-آلفا استرادیول، استرون، استریول، گاماتوکوفرول و بسیاری که ترکیبات شیمیایی دیگر که اغلب پتانسیل ضدمیکروبی دارند، می‌باشد (۷).

به علاوه در پژوهش‌های مختلف نیز قابلیت قسمت‌های مختلف میوه انار در مهار میکروارگانیسم‌های مختلف تایید شده است. برای مثال ALam Khan و همکاران نشان دادند که عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی پوست انار در آزمون انتشار دیسک باکتری‌های استافیلوکوکوس ارئوس، اشرشیا کلی و پسودوموناس آئروژینوزا را به خوبی مهار می‌کند. همچنین در این بررسی مشخص شد که اثربخشی عصاره‌های اتانولی از انواع دیگر بهتر بوده و قدرت مهاری عصاره با غلظت آن رابطه مستقیم دارد (۸).

در بررسی‌های مختلف دیگر نیز قابلیت مهاری عصاره‌های متانولی و اتانولی پوست انار بر باکتری‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، استرپتوکوکوس موتانس، کاندیدا آلبیکنس (۷)، شیگلا فلکسنری، آئروموناس هیدروفیلا (۹) و میکروارگانیسم‌های دهانی نظیر اکتینومایسس ویسکوزیس و لاکتوباسیلوس فرمنتوم (۱۰) تایید شده است. در مهار ساختارهای بیوفیلمی بررسی‌های کمتری انجام شده است. در مطالعه Zahin و همکاران مشخص شد که عصاره‌های پوست انار حرکت سوآرمینگ را در سویه‌های مختلف کروموباکتر و یولاسئوم تا ۶۵ درصد مهار کرده و از انجام کئوروم سنسینگ ممانعت می‌نمایند. از این‌رو عصاره‌های مذکور اثر مناسبی در مهار پدیده تشکیل بیوفیلم باکتری مورد بررسی دارند (۱۱).

همچنین در مطالعه دیگری مشخص گردید که عصاره‌های پوست انار از تشکیل بیوفیلم در باکتری پسودوموناس آئروژینوزا ممانعت می‌نمایند (۱۲). اگر چه پیش از این مطالعاتی بر خواص ضدمیکروبی پوست انار انجام شده است اما اغلب این بررسی‌ها بر فرم منفرد میکروارگانیسم‌ها بوده و به ساختارهای بیوفیلمی توجه کمتری شده است. با توجه به این نکته و مشکلات ناشی از تشکیل بیوفیلم‌های میکروبی در صنعت و پزشکی و به منظور دستیابی به ترکیبات موثر در مقابله با این ساختارها، این مطالعه به منظور بررسی خواص مهاری عصاره‌های الکلی پوست انار بر فرم منفرد و ساختارهای بیوفیلمی شش باکتری پاتوژن شامل سه باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس ارئوس، باسیلوس سرئوس و استرپتوکوکوس پنومونیه و سه باکتری گرم منفی پسودوموناس آئروژینوزا، اشرشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه که با کسب مقاومت‌های دارویی مشکلات بسیاری را ایجاد نموده‌اند، انجام شد.

مواد و روشها

این بررسی تحقیقاتی همراه با کار آزمایشگاهی، در آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه شهید باهنر کرمان انجام گردید.

تهیه عصاره‌های گیاهی: پوست میوه گیاه انار جدا و به مدت ۲ هفته در سایه خشک شده و به کمک آسیاب برقی و الک تا حد ممکن پودر گردید. به منظور تهیه عصاره‌های الکلی مقدار ۵۰ گرم از پودر پوست میوه انار به ترتیب به ارلن های حاوی ۵۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد و ۵۰۰ میلی‌لیتر متانول ۹۶ درصد وارد و درب ارلن‌ها با ورقه آلومینیومی کاملا بسته شد. به منظور بهبود فرآیند عصاره‌گیری، ارلن‌ها به دستگاه شیکر با سرعت ۱۸۰ دور در دقیقه و دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۲۴ ساعت منتقل شدند. سپس محتویات هر ارلن برای حذف قطعات اضافی، از کاغذ صافی عبور داده شده و محلول حاصل جهت تبخیر حلال به دستگاه روتاری انتقال یافت.

پس از این ماده به دست آمده در آون ۴۰ درجه سانتی‌گراد به پودر خشک عصاره تبدیل و مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم از آن در حجم مناسبی از دی متیل سولفوکساید حل و با عبور از فیلتر میلی‌پور استریل گردید. سپس این محلول با افزودن آب مقطر استریل به حجم ۱ میلی‌لیتر رسانده شده و به عنوان محلول ذخیره عصاره (۱۰۰ mg/ml) تا زمان مصرف در ظروف شیشه‌ای استریل و تیره در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۱۳).

باکتری‌های مورد بررسی: ارزیابی قابلیت مهاری عصاره‌های تهیه شده از پوست انار بر باکتری‌های گرم مثبت استافیلوکوکوس ارئوس، باسیلوس سرئوس و استرپتوکوکوس پنومونیه و همچنین باکتری‌های گرم منفی پسودوموناس آئروژینوزا، اشرشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه انجام شد. استافیلوکوکوس ارئوس، اشرشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه سویه‌های جداسازی شده از بیماران بوده و از آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی کرمان تهیه شدند. باسیلوس سرئوس سویه جدا سازی شده از دام بوده و از دانشکده دامپزشکی دانشگاه باهنر تهیه گردید. پسودوموناس آئروژینوزا نیز سویه جداشده از خاک بوده و از دانشکده علوم دانشگاه باهنر تهیه شد. کشت مرجع میکروارگانیسم‌های مذکور در یخچال نگهداری شده و هر ماه در نوترینت آگار تجدید کشت گردید. در مورد استرپتوکوک پنومونیه از محیط بلاد آگار استفاده شد.

سنجش قابلیت مهاری عصاره های گیاهی در آزمون انتشار دیسک: خواص ضد میکروبی عصاره های الکلی پوست انار بر فرم منفرد میکروارگانیسم های مورد بررسی در آزمون انتشار دیسک بررسی گردید. در ابتدا برای تعیین میزان جذب هر دیسک بلانک، ۵ عدد دیسک بلانک به ترتیب به ویال های مدرج حاوی اتانول ۸۰ درصد و متانول ۹۶ درصد وارد و به مدت دو ساعت باقی ماندند. پس از خروج دیسک ها میزان کاهش حلال اندازه گیری و بر اساس آن میزان جذب هر دیسک تعیین شد. برای تهیه دیسک‌های آغشته به عصاره نیز ۵ عدد دیسک بلانک استریل به مدت دو ساعت در محلول ذخیره عصاره (mg/ml ۱۰۰) وارد و سپس به منظور حذف حلال اضافی، دیسک ها در شرایط آسپتیک به پلیت استریل منتقل و در آون ۴۰ درجه قرار گرفتند (۱۴).

در این بررسی دیسک آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل (µg/disc ۳۰) شاهد مثبت و دیسک‌های آغشته به اتانول، متانول و دی متیل سولفوکساید شاهد منفی آزمایش بودند. جهت انجام آزمون انتشار دیسک، کشت ۲۴ ساعته از محیط مرجع هر باکتری در محیط نوترینت تهیه و پس از آن هر سوسپانسیون تا رسیدن به کدورتی معادل ۰/۵ مک فارلند (Mc farland ۰/۵) رقیق گردید. از این سوسپانسیون‌ها به کمک سوآب استریل در محیط مولر هینتون آگار کشت سفره-ای انجام شده و سپس در شرایط آسپتیک دیسک‌های آغشته به عصاره، حلال و آنتی‌بیوتیک به آرامی و با فواصل منظم بر سطح هر پلیت قرار گرفتند. پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شده و قطر هاله‌های مهاری هر دیسک با خط‌کش میلی‌متری اندازه‌گیری گردید (۱۵).

تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی و حداقل غلظت کشندگی عصاره های گیاهی: حداقل غلظت مهار کننده(Minimum Inhibitory Concentration) عصاره های پوست انار طبق پروتکل (National Committee =NCCLS

[DOR: 20.1001.1.15614107.1393.17.1.10.3]
[DOI: 10.22088/jbums.17.1.77]

for Clinical Laboratory Standards) و با روش ماکروبراث دایلوشن تعیین شد (۱۶).

در ابتدا ده غلظت mg/ml ۵۰-۰/۰۲ به شیوه رقیق سازی متوالی (۱۷) از محلول ذخیره عصاره تهیه و مورد استفاده قرار گرفت. برای این منظور به ده لوله آزمایش استریل مقدار ۱ میلی‌لیتر محیط نوترینت براث استریل افزوده و به لوله‌ی اول ۱ میلی‌لیتر از محلول ذخیره عصاره وارد شد. محتویات لوله مذکور به خوبی مخلوط گردید تا غلظت نهایی عصاره در آن برابر mg/ml ۵۰ شود. سپس ۱ میلی‌لیتر از این محلول در شرایط آسپتیک به لوله دوم منتقل و به خوبی مخلوط شد تا غلظت عصاره نصف لوله اول و برابر mg/ml ۲۵ گردد. غلظت‌های سوم تا دهم عصاره نیز به همین ترتیب در لوله های بعدی تهیه شد. پس از این به هر غلظت ۱ میلی‌لیتر از کشت ۲۴ ساعته باکتری در محیط نوترینت براث که کدورتی معادل ۰/۵ مک فارلند داشت، افزوده گردید.

لوله‌های کنترل مثبت در این آزمون حاوی سوسپانسیون میکروبی و آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین (mg/ml ۲)، لوله‌های کنترل منفی حاوی سوسپانسیون میکروبی و آب مقطر استریل و نهایتا لوله‌های شاهد عصاره حاوی غلظت مورد نظر از عصاره و محیط نوترینت براث بودند. در نهایت لوله‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ ساعت انکوبه شده و با مقایسه کدورت ایجاد شده در لوله‌های آزمون با کدورت کنترل منفی و شاهد عصاره، کمترین غلظتی که رشد باکتری در آن مهار شده بود به عنوان MIC انتخاب گردید. برای محاسبه حداقل غلظت کشندگی (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) عصاره‌های پوست انار از لوله‌های آزمون MIC، در محیط مولر هینتون آگار فاقد عصاره گیاهی کشت انجام و کمترین غلظتی که باکتری در آن رشد نکرد به عنوان MBC انتخاب شد.

بررسی قابلیت عصاره‌های گیاهی در مهار پدیده‌ی تشکیل بیوفیلم: قابلیت عصاره های الکلی پوست انار در مهار پدیده تشکیل بیوفیلم باکتری های انتخابی با روش میکرو تیتر پلیت سنجیده شد. در ابتدا یک کشت ۱۸ ساعته از محیط مرجع هر باکتری در محیط تریپتیکاز سوی براث (Tryptic Soy Broth, TSB) تهیه و تا رسیدن به کدورتی معادل ۱ مک فارلند رقیق گردید. در این آزمون اثر مهاری سه غلظت mg/ml ۲۰-۵ از عصاره ها که به روش رقیق سازی متوالی و با افزودن TSB استریل به محلول ذخیره عصاره تهیه شده بودند، مورد بررسی قرار گرفت. نخست به چاهک های آزمون میکروپلیت ۹۶ خانه، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از هر غلظت عصاره در شرایط آسپتیک وارد و سپس به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتریایی افزوده شد. در نهایت میکروپلیت به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، بدون حرکت انکوبه گردید. در این آزمون چاهک کنترل مثبت، کنترل منفی و چاهک شاهد عصاره همانند آزمون تعیین MIC در نظر گرفته شدند (۱۸).

اثر مهاری غلظت‌های مختلف عصاره پس از انکوباسیون به کمک رنگ آمیزی کریستال ویوله تعیین شد. برای این منظور محتویات هر چاهک به آرامی آسپیره و سپس دو مرتبه با بافر سالین فسفات شسته شد. پس از این ۱۵۰ میکرو-لیتر متانول به مدت ۱۵ دقیقه جهت تثبیت ساختارهای بیوفیلمی به چاهک‌ها افزوده گردید. بعد از آسپیره متانول، ۲۰۰ میکرولیتر رنگ کریستال ویوله ۱ درصد به چاهک‌ها وارد و میکروپلیت به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. رنگ اضافی با جریان آرام آب شیر از چاهک‌ها شسته شده و پلیت در دمای اتاق خشک گردید. جذب نوری هر چاهک پس از افزودن ۱۶۰ میکرولیتر اسید استیک گلاسیال ۳۳ درصد با دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۶۳۰ نانومتر معین شد (۱۹). درصد مهار تشکیل پدیده تشکیل بیوفیلم در تیمار با عصاره‌های پوست انار به کمک فرمول زیر محاسبه شد (۲۰):

$$\text{Inhibition percent}=100\times\left[\frac{(C-B)-(T-E)}{(C-B)}\right]$$

در این فرمول C میانگین جذب نوری چاهک‌های کنترل منفی، B میانگین جذب نوری چاهک‌های کنترل محیط، T میانگین جذب نوری چاهک‌های آزمون در غلظت مورد نظر و E میانگین جذب نوری چاهک‌های شاهد عصاره همان غلظت می‌باشد.

بررسی قابلیت عصاره‌های گیاهی در تخریب ساختارهای بیوفیلمی: جهت تعیین قابلیت عصاره‌های پوست انار در تخریب ساختارهای بیوفیلمی، ابتدا بیوفیلم هر باکتری تشکیل و سپس غلظت‌های انتخابی عصاره (mg/ml ۲۰-۵) بر این ساختارها اثر داده شد. در این آزمون نیز چاهک کنترل مثبت، کنترل منفی و چاهک شاهد عصاره همانند آزمون تعیین MIC در نظر گرفته شدند.

به منظور تشکیل بیوفیلم، ۱۰۰ میکرولیتر از کشت ۱۸ ساعته باکتری‌ها در محیط TSB با کدورتی معادل ۱ مک فارلند به چاهک‌های آزمون و کنترل منفی میکروپلیت وارد و پس از آن پلیت بدون حرکت در دمای ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید. در میکروپلیت مذکور به چاهک‌های شاهد محیط کشت و شاهد عصاره این میکروپلیت نیز ۱۰۰ میکرولیتر محیط TSB استریل افزوده شده بود. پس از انکوباسیون، محتویات چاهک‌ها در شرایط آسپتیک آسپیره و چاهک‌ها دو مرتبه با بافر سالین فسفات شسته شدند تا سلول‌های پلانکتونیک موجود در هر چاهک حذف گردد. سپس مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های انتخابی عصاره به چاهک‌های آزمون و شاهد عصاره افزوده و پلیت برای ۲۴ ساعت دیگر در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و بدون حرکت انکوبه گردید (۲۱).

پس از انکوباسیون میزان تخریب ساختارهای بیوفیلمی با روش رنگ‌آمیزی کریستال ویوله بررسی و درصد تخریب ساختارهای مذکور به کمک فرمولی که پیش تر اشاره شد، محاسبه گردید.

بررسی قابلیت عصاره های گیاهی در مهار فعالیت متابولیکی ساختارهای بیوفیلمی در این آزمون ابتدا ساختارهای بیوفیلمی تشکیل و سپس غلظت های انتخابی عصاره (mg/ml ۲۰-۵) بر این ساختارها اثر داده شد. پس از گذشت زمان انکوباسیون مقدار ۵۰ میکرو لیتر از رنگ TTC (Triphenyl Tetrazolium Chloride) به چاهک های میکروپلیت افزوده و سپس پلیت به مدت سه ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. پس از این مدت جذب نوری چاهک ها در طول موج ۴۹۰ نانومتر تعیین شده و درصد مهار فعالیت متابولیکی سلول ها نیز به کمک فرمولی که پیش از این اشاره شد، مشخص گردید (۲۳و۲۲).

تحلیل آماری یافته‌ها: کلیه آزمون‌ها در این پژوهش با سه تکرار انجام شده، اختلاف بین داده‌ها با آزمون آنالیز واریانس، اختلافات حقیقی بین گروه‌ها در آزمون انتشار دیسک به کمک تست Duncan و در آزمون‌های انجام شده بر ساختارهای بیوفیلمی با آزمون LSD بررسی شد و $p<0/05$ معنی دار در نظر گرفته شد

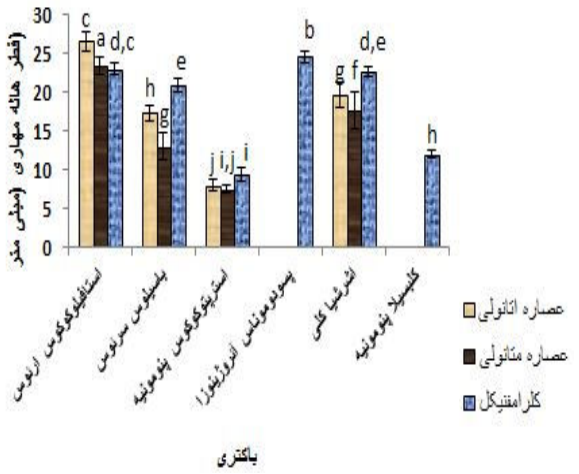
[DOR: 20.1001.1.15614107.1393.17.1.10.3]
[DOI: 10.22088/jbums.17.1.77]

یافته ها

قابلیت مهاری عصاره‌های گیاهی بر فرم منفرد: از آن‌جا که کاهش حجم اتانول و متانول در مجاورت با ۵ دیسک بلانک برابر ۰/۱ ml بوده، می‌توان چنین نتیجه گرفت که هر دیسک مقدار ۰/۰۲ ml از حلال را به خود جذب می‌نماید. بر این اساس زمانی که دیسک‌های بلانک را به محلول‌های عصاره با غلظت ۱۰۰ mg/ml وارد نمودیم، مقدار عصاره جذب شده به هر دیسک برابر ۲ mg/ml می‌باشد. نمودار ۱ هاله‌های مهاری مربوط به دیسک عصاره‌های پوست انار بر باکتری‌های مورد مطالعه را نشان داده و مقادیر MIC و MBC عصاره های مذکور در جدول ۱ آمده است.

بر این اساس در آزمون انتشار دیسک، اثربخشی عصاره‌های اتانولی بر فرم منفرد باکتری‌های مورد بررسی بیشتر از نوع متانولی می‌باشد. در این آزمون عصاره‌های پوست انار با ایجاد هاله مهاری باکتری‌های استافیلوکوکوس ارئوس، باسیلوس سرئوس و اشرشیاکلی را به خوبی مهار کردند. میانگین قطر هاله مهاری ایجاد شده بر این باکتری‌ها به ترتیب ۲۵ mm، ۱۵/۱۵ mm و ۱۸/۶۵ mm می‌باشد (p<۰/۰۱). برخلاف این عصاره‌های پوست انار قادر به ایجاد هاله مهاری بر باکتری‌های استرپتوکوکوس پنومونیه، پسودوموناس آئروژینوزا و کلبسیلا پنومونیه نبودند و از این‌رو قابلیت مهاری عصاره‌ها بر باکتری‌های نامبرده معنی‌دار نمی‌باشد (نمودار ۱). همچنین باکتری استافیلوکوکوس ارئوس بیشترین حساسیت را به عصاره‌های پوست انار نشان داد.

علی‌رغم مشاهدات مذکور، در آزمون MIC عصاره‌های پوست انار تمامی باکتری‌های مورد بررسی را به خوبی مهار کردند. قابلیت مهاری انواع متانولی عصاره در آزمون MIC بیشتر از انواع اتانولی است به جز باکتری اشرشیا کلی که انواع متانولی و اتانولی عصاره با قدرت برابری قادر به مهار این باکتری بوده و هم‌چنین استرپتوکوکوس پنومونیه و کلبسیلا پنومونیه که قابلیت مهاری انواع اتانولی عصاره بر آن‌ها بیشتر است. بیشترین اثر مهاری در آزمون MIC از عصاره‌ی اتانولی پوست انار بر باسیلوس سرئوس وکمترین اثر مهاری نیز از عصاره‌ی اتانولی گیاه مذکور بر پسودوموناس آئروژینوزا مشاهده شد (جدول ۱).

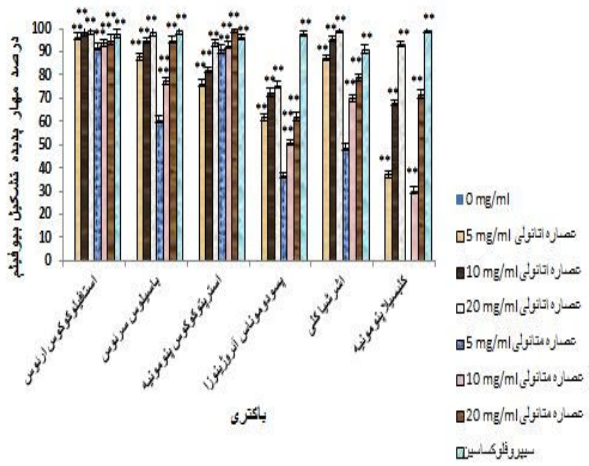


نمودار ۱. مقایسه قطر هاله مهاری عصاره‌های پوست انار و آنتی‌بیوتیک شاهد (mm). حروف مشابه a, b, c, ... بر هر ستون بر اساس آزمون Duncan بوده و نشان می‌دهد که این مقادیر با یکدیگر در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌دار ندارند

جدول ۱. مقادیر MIC و MBC عصاره‌های اتانولی و متانولی پوست انار بر باکتری‌های مورد بررسی. مقادیر بر حسب mg/ml می‌باشند

باکتری	MICعصاره متانولی	MICعصاره اتانولی	MBCعصاره متانولی	MBCعصاره اتانولی
استافیلوکوکوس ارئوس	۰/۱۹	۰/۳۹	۱/۵۶	۰/۷۸
باسیلوس سرئوس	۰/۳۹	۰/۰۹	۰/۷۸	۰/۳۹
استرپتوکوکوس پنومونیه	۰/۳۹	۰/۱۹	۰/۷۸	۰/۳۹
پسودوموناس آئروژینوزا	۱/۵۶	۳/۱۲	۶/۲۵	۱۲/۵
اشرشیا کلی	۰/۱۹	۰/۱۹	۱/۵۶	۰/۷۸
کلبسیلا پنومونیه	۰/۷۸	۱/۵۶	۱/۵۶	۱/۵۶

قابلیت عصاره‌های گیاهی در مهار ساختارهای بیوفیلمی: قدرت مهاری هریک از غلظت‌های انتخابی عصاره‌های پوست انار در مهار پدیده تشکیل بیوفیلم، تخریب ساختارهای بیوفیلمی و مهار فعالیت متابولیکی این ساختارها به ترتیب در نمودارهای ۲، ۳ و ۴ آمده است. با توجه به نتایج حاصل، عصاره‌های مذکور قابلیت بالایی در مهار ساختارهای بیوفیلمی نشان دادند. بر این اساس در آزمون‌های انجام شده بر ساختارهای بیوفیلمی، نوع باکتری، نوع حلال و غلظت عصاره بر قابلیت مهاری آن موثر است. غلظت هر عصاره با اثرگذاری آن رابطه مستقیم داشته و با افزایش غلظت، اثر مهاری نیز افزایش می‌یابد. اثرگذاری هریک از این پارامترها بر قدرت مهاری عصاره معنی‌دار می‌باشد (p<۰/۰۱) (نمودار ۲).

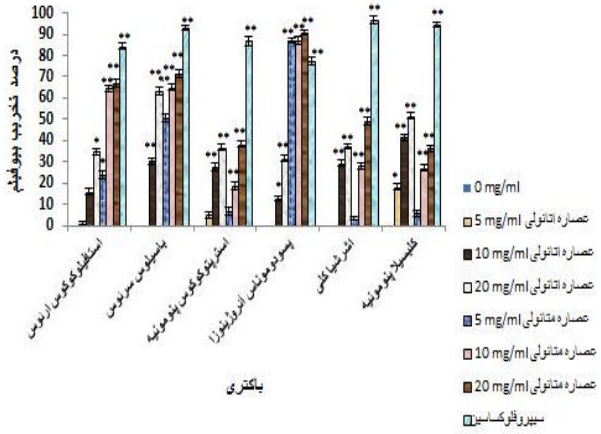


نمودار ۲. مقایسه اثر مهاری غلظت‌های متفاوت عصاره‌های الکلی پوست انار بر تشکیل بیوفیلم باکتری‌های انتخابی. * نشان‌دهنده مهار معنی‌دار پدیده تشکیل بیوفیلم در تیمار با آن غلظت (p<۰/۰۵) و ** نشان‌دهنده مهار معنی‌دار پدیده تشکیل بیوفیلم در تیمار با آن غلظت (p<۰/۰۱)

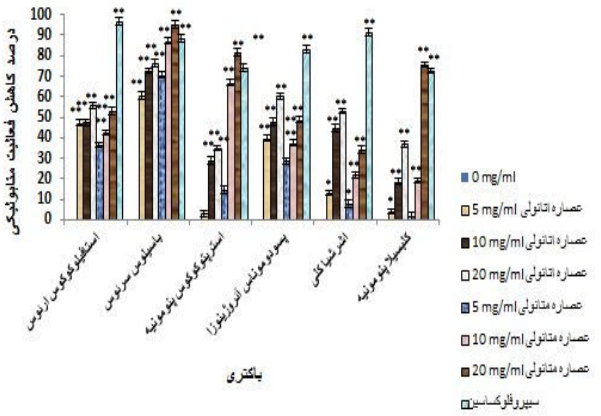
بر اساس میانگین اثر مهاری غلظت‌های انتخابی عصاره‌های پوست انار، عصاره-های مذکور قابلیت مهار حداقل ۵۰ درصدی پدیده تشکیل بیوفیلم را در باکتری‌های مورد بررسی داشته و با توجه به آنالیز آماری یافته‌ها، قابلیت عصاره‌ها

[DOR: 20.1001.1.15614107.1393.17.1.10.3]
[DOI: 10.22088/jbums.17.1.77]

در مهار پدیده تشکیل بیوفیلم معنی‌دار است (p<۰/۰۱). در این آزمون بیشترین اثر مهاری در باکتری استافیلوکوکوس ارئوس (۹۵/۸۴ ٪) و کمترین اثر مهاری بر تشکیل بیوفیلم کلبسیلا پنومونیه (۵۰/۱۴ ٪) مشاهده شد. در تخریب ساختارهای بیوفیلمی، بیوفیلم‌های پسودوموناس آئروژینوزا حساس‌ترین (۵۱/۴۸ ٪) و استرپتوکوس پنومونیه (۲۲/۲۱ ٪) مقاوم‌ترین ساختارها را تشکیل دادند. فعالیت متابولیکی بیوفیلم‌ها نیز در تیمار با عصاره‌های پوست انار به حد قابل توجه‌ای کاهش یافت که باسیلوس سرئوس بیشترین (۷۷/۱۳ ٪) و باکتری کلبسیلا پنومونیه (۲۶/۱۰ ٪) کاهش را نشان دادند. تحلیل آماری داده‌های حاصل از این دو آزمون نشان می‌دهد که کارایی عصاره‌های پوست انار در تخریب بیوفیلم و مهار فعالیت متابولیکی سلول‌های این ساختارها معنی‌دار می‌باشد (p<۰/۰۱) (نمودار ۴و۳).



نمودار ۳. مقایسه قابلیت غلظت‌های متفاوت عصاره‌های الکلی پوست انار در حذف ساختارهای بیوفیلمی باکتری‌های انتخابی. * نشان‌دهنده‌ی تخریب موثر ساختارهای بیوفیلمی در تیمار با آن غلظت (p<۰/۰۵) و ** نشان‌دهنده تخریب موثر ساختارهای بیوفیلمی در تیمار با آن غلظت (p<۰/۰۱)



نمودار ۴. مقایسه اثر غلظت‌های متفاوت عصاره‌های الکلی پوست انار در مهار فعالیت متابولیک بیوفیلم باکتری‌های انتخابی. * نشان‌دهنده مهار معنی‌دار فعالیت آنزیم دهیدروژناز در تیمار با آن غلظت (p<۰/۰۵) و ** نشان دهنده مهار معنی‌دار فعالیت آنزیم دهیدروژناز در تیمار با آن غلظت (p<۰/۰۱)

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه قابلیت بالای عصاره‌های الکلی پوست انار در مهار فرم منفرد و بیوفیلمی میکروارگانیسم‌های انتخابی معین و مشخص گردید چنانچه پس از عصاره‌گیری به روش ماسراسیون، تغلیظ انجام شود خاصیت مهاری عصاره افزایش چشمگیری خواهد داشت. در آزمون انتشار دیسک عصاره‌های پوست انار قابلیت بالایی در مهار رشد استافیلوکوکوس ارئوس، باسیلوس سرئوس و اشرشیا کلی نشان دادند، درحالی‌که عصاره‌های مذکور قادر به مهار سایر باکتری‌ها نبودند. با وجود این عصاره‌های پوست انار رشد تمامی باکتری‌های انتخابی را در محیط مایع به کاررفته در آزمون MIC را به خوبی مهار کردند. بر این اساس می‌توان چنین نتیجه گرفت که ترکیبات با خواص ضدمیکروبی موجود در عصاره‌های مذکور همانند بسیاری از عصاره‌های گیاهی دیگر، قابلیت ضعیفی در انتشار در محیط جامد داشته و در محیط مایع کارآمدترند.

مقادیر MIC عصاره‌های مذکور در محدوده غلظتی ۳/۱۲-۰/۰۹ mg/ml و مقادیر MBC در بازه غلظتی ۱۲/۵-۰/۳۹ mg/ml به دست آمد که این مقادیر خود موید قابلیت مهاری مناسب این گیاه می‌باشد. همچنین بیشتر بودن مقادیر MBC نسبت به MIC نشانگر خاصیت باکتریواستاتیکی عصاره‌های پوست انار است. در بررسی‌های دیگر نیز قابلیت مهاری عصاره‌های اجزاء مختلف گیاه انار بر میکروارگانیسم‌های پاتوژن تایید شده است. برای مثال Abdollahzadeh و همکاران اثر مهاری عصاره‌های متانولی پوست انار را بر سویه استاندارد استافیلوکوکوس ارئوس (ATCC 25923) را در آزمون انتشار دیسک تایید نمودند. در این بررسی دیسک‌های حاوی ۳ غلظت ۱۲، ۸، ۴ mg/ml بر باکتری مذکور اثر داده شده و قطر هاله‌های به دست آمده به ترتیب ۷/۵، ۱۱/۵، ۱۲/۵ mm می‌باشد (۷). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که با افزایش غلظت عصاره، قطر هاله مهاری نیز افزایش می‌یابد. عصاره‌های تهیه شده در مطالعه Abdollahzade و همکاران در غلظت بیشتر هم کارایی کمتری نسبت به عصاره‌های بررسی پیش‌رو نشان دادند. این تفاوت می‌تواند به دلیل تفاوت در حساسیت سویه‌های مورد مطالعه و مدت زمان عصاره‌گیری باشد. در بررسی Abdollahzade و همکاران پودر پوست انار به مدت ۳۰ روز در متانول باقی مانده و حلال مرتبا جایگزین شده است که همین می‌تواند قدری از اجزاء موثره عصاره را کاهش داده باشد.

در مطالعه دیگر، Pai و همکاران قابلیت مهاری مناسب عصاره‌های پوست انار بر سه سویه باکتری اشرشیاکلی را به کمک آزمون انتشار دیسک تایید کردند. همچنین آن‌ها نشان دادند که عصاره‌های اتانولی به روش سوکسله اثر مهاری بیشتری نسبت به انواع آبی عصاره دارند که به شیوه جوشاندن به دست آمده می‌آیند. افزایش اثر مهاری با افزایش غلظت عصاره نیز با بررسی ۵ غلظت ۱، ۳، ۵، ۷ و ۹ درصد در این مطالعه تایید گردید. قطر هاله‌های مربوط به دیسک‌های اتانولی این بررسی در غلظت‌های نامبرده به ترتیب ۱۲، ۱۴، ۱۶، ۱۹ و ۱۹ میلی‌متر می‌باشد (۹). تفاوت اندک در نتایج این مطالعه با پژوهش پیش رو با توجه به تفاوت در سویه های مورد بررسی و روش متفاوت عصاره‌گیری منطقی است. در مطالعه Khan و همکاران تهیه عصاره‌های اتانولی و متانولی پوست انار و دیسک‌های آغشته به عصاره با روشی کاملا مشابه با این مطالعه انجام شده است. در این مطالعه اثر بخشی این عصاره‌ها بر فرم منفرد سه سویه بالینی استافیلوکوکوس ارئوس، اشرشیاکلی و پسودوموناس آئروژینوزا تایید گردید. قطر

[DOR: 20.1001.1.15614107.1393.17.1.10.3]
[DOI: 10.22088/jbums.17.1.77]

هاله مهاری دیسک‌های آغشته به عصاره اتانولی هریک از باکتری‌های نامبرده به ترتیب ۲۵/۵، ۲۲/۵ و ۲۵/۵ بوده و برای عصاره‌های متانولی به ترتیب ۲۲/۵، ۲۱ و ۲۳/۵ می‌باشد (۸). نتایج این بررسی بر باکتری‌های استافیلوکوکوس ارئوس و اشرشیاکلی بسیار به مطالعه حاضر نزدیک است که با توجه به روش عصاره‌گیری یکسان و غلظت برابر دیسک‌های عصاره منطقی می‌باشد. اما در مورد پسودوموناس آئروژینوزا نتایج کاملا متفاوتی به دست آمده که با توجه به موارد ذکرشده، این تفاوت تنها به علت تفاوت سویه‌های مورد بررسی و الگوی مقاومتی متفاوت در آن‌ها ایجاد شده است. در این مطالعه عصاره‌های پوست انار در مهار ساختارهای بیوفیلمی نیز بسیار کارآمد بودند. اثر مهاری عصاره‌ها با غلظت رابطه مستقیم داشته و اثربخشی هر عصاره به نوع حلال وابسته است. قابلیت عصاره-های انتخابی در مهار پدیده تشکیل بیوفیلم تمامی باکتری‌ها بیشتر از قدرت آن‌ها در تخریب ساختارهای بیوفیلمی است. میزان تخریب ساختارهای بیوفیلمی پسودوموناس آئروژینوزا در تیمار با عصاره‌های پوست انار بیشتر از مقدار مهار فعالیت آنزیم دهیدروژناز سلول‌های این باکتری در بیوفیلم می‌باشد. این درحالی است که قابلیت عصاره‌های پوست انار در تخریب ساختارهای بیوفیلمی و مهار فعالیت متابولیکی باکتری کلبسیلا پنومونیه تفاوت چندانی نشان نمی‌دهد. در تیمار سایر باکتری‌های مورد مطالعه با عصاره‌های گیاهی نیز مهار فعالیت متابولیکی سلول‌ها در محیط بیوفیلم بهتر از تخریب ساختارهای بیوفیلمی انجام می‌شود. با توجه به اینکه ترکیبات موثره عصاره‌های پوست انار و مکانیسم اثر مهاری آن‌ها بر ساختارهای بیوفیلمی در این مطالعه بررسی نگردید، می‌توان با شناسایی عناصر مذکور و با توجه به مولکول‌های کلیدی متفاوت که در فرآیند تشکیل بیوفیلم باکتری‌های مورد مطالعه دخیل هستند، اختلافات مشاهده شده را تحلیل نمود. در سایر پژوهش‌ها به خواص ضدبیوفیلمی گیاه انار توجه کمتری شده و بررسی‌های انجام شده بیشتر با تمرکز بر پدیده کئوروم سنسینگ بوده اند که نقش مهمی در تشکیل ساختارهای بیوفیلمی دارد. در مطالعه Mansouri و همکاران قابلیت عصاره‌های متانولی پوست انار در مهار کئوروم سنسینگ در شش سویه از باکتری پسودوموناس آئروژینوزا تایید شده و این عصاره‌ها تولید کلنی‌های موکوئیدی را نیز در این باکتری مهار می‌کنند (۱۲).

از این‌رو می‌توان نتیجه گرفت که عصاره‌های پوست انار قابلیت مناسبی در مهار پدیده تشکیل بیوفیلم پسودوموناس آئروژینوزا دارند که این امر در مطالعه حاضر نیز تایید گردید. با توجه به نتایج حاصل در این پژوهش و مطالعات انجام شده بر اسانس‌ها و عصاره‌های قسمت‌های مختلف گیاه انار، ترکیبات مذکور گزینه‌های مناسبی در مهار فرم منفرد و ساختارهای بیوفیلمی میکروارگانیسم‌های پاتوژن می‌باشند. از این‌رو بررسی بیشتر به منظور شناسایی مکانیسم اثربخشی عصاره‌های مذکور بر ساختارهای بیوفیلمی برای دستیابی به یک منبع ضدمیکروبی مناسب در مقابله با میکروارگانیسم‌های پاتوژن به ویژه در شکل بیوفیلمی توصیه می‌گردد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه شهید باهنر کرمان بدلیل حمایت مالی از این پایان نامه تشکر و قدردانی می گردد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1393.17.1.10.3]
[DOI: 10.22088/jbums.17.1.77]

The Antimicrobial Effects of the Alcoholic Extracts of Pomegranate (Punica Granatum) on the Planktonic Forms and Biofilm Structures of Six Pathogenic Bacteria

Z. Mohsenipour (MSc)[1], M. Hassanshahian (PhD)*[2]

1-Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, I.R.Iran.

J Babol Univ Med Sci; 17(1); Jan 2015; PP:77-84

Received: Apr 21th 2014, Revised: May 14th 2014, Accepted: Jun 25th 2014.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE In traditional medicine, pomegranate is used for the treatment of intestinal worms and diarrhea. This study aimed to examine the antibacterial activities of pomegranate extracts on biofilm structures and planktonic forms of six pathogenic bacteria.

METHODS: In this study, the inhibitory effect of the extracts on planktonic forms was determined, using disc diffusion method. Minimum inhibitory concentration (MIC) of 0.02 mg/ml and maximum inhibitory concentration of 50 mg/ml were determined, using broth macrodilution. Anti-biofilm effects at 5 mg/ml, 10 mg/ml, and 20 mg/ml concentrations were assessed using microtiter plate method. Also, biofilm formation, biofilm degradation, and dehydrogenase enzyme activity were determined by crystal violet staining.

FINDINGS: Discs impregnated with pomegranate extracts inhibited the growth of test bacteria by 50% ($P<0.01$). However, no inhibitory effect was detected on streptococcus pneumoniae, pseudononas aeruginosa, or klebsiella pneumonia ($p>0.05$). In the broth medium of MIC test, the extracts could inhibit the growth of all bacteria (70%). These extracts damaged the biofilm structures by 50% (minimum) and 95% (maximum), respectively. The inhibitory effect of the extracts was dependent on the extract concentration and type of solvent. Pomegranate extracts were most efficient in inhibiting the biofilm formation of staphylococcus aureus (95.84%). The greatest eradication of biofilm structures was observed in the biofilm of pseudomonas aeruginosa (51.48%). Also, the highest decrease in metabolic activity was observed in bacillus cereus (77.13%).

CONCLUSION: In this study, the inhibitory effect of pomegranate extracts on planktonic forms and biofilm structures was confirmed. As it was shown, the inhibitory effect was correlated with the solvent type and extract concentration.

KEY WORDS: *Biofilm, Punica Granatum, Pathogenic Bacteria, Drug Resistance, Antimicrobial Effect.*

Please cite this article as follows:

Mohsenipour Z, Hassanshahian M. The Antimicrobial Effects of the Alcoholic Extracts of Pomegranate (Punica Granatum) on the Planktonic Forms and Biofilm Structures of Six Pathogenic Bacteria. J Babol Univ Med Sci. 2015; 17(1):77-84.

* **Corresponding Author; M. Hassanshahian (PhD)**
Address: Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, I.R.Iran.
Tel: +98 34 33222032
E-mail: mshahi@uk.ac.ir

[DOR: 20.1001.1.15614107.1393.17.1.10.3]
[DOI: 10.22088/jbums.17.1.77]

References

1. Jefferson KK. What drives bacteria to produce a biofilm? FEMS Microbiol Lett. 2004;236(2):163-73.
2. Thomas JG, Posey SP. Emergence of oral/dental microbiology. Adv Health Care Net Lab. 2009;18(6): 35-8.
3. Das K, Tiwari RKS, Shrivastava DK. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends. J Med Plan Res. 2010;4(2):104-11.
4. Kavanaugh NL, Ribbeck K. Selected antimicrobial essential oils eradicate Pseudomonas spp. and Staphylococcus aureus biofilms. Appl Environ Microbiol. 2012;78(11):4057-61.
5. Emami A, Ahi A. Medical bothany, 2nd ed. Mashhad: Mashhad Univ Med Sci. Inc.; 2012. p: 278-413.[In Persian].
6. Kargioglu M, Cenkci S, Serteser A, Konuk M, Vural G. Traditional uses of wild plants in the middle Aegean region of Turkey. Hum Ecol. 2010;38(3):429-50.
7. Abdollahzadeh Sh, Mashouf R, Mortazavi H, Moghaddam M, Roozbahani N, Vahedi M. Antibacterial and antifungal activities of Punica granatum peel extracts against oral pathogens. J Dent(Tehran). 2010;8(1):1-6.
8. Khan AJ, Hanee S. Antibacterial properties of Punica granatum peels. Int J Appl Biol Pharmaceut Technol. 2011;2(3):23-7.
9. Pai V, Rubee Chanu T, Chakraborty R, Raju B, Lobo R, Ballal M. Evaluation of the antimicrobial activity of Punica granatum peel against the enteric pathogens: An in vitro study. Asian J Plant Sci Res. 2011;1(2):57-63.
10. Vahabi S, Najafi E, Alizadeh S. In vitro antimicrobial effects of some herbal essences against oral pathogens. J Med Plants Res. 2011;5(19):4870-8.
11. Zahin M, Hasan S, Aqil F, Khan MS, Husain FM, Ahmad I. Screening of certain medicinal plants from India for their anti-quorum sensing activity. Ind J Exp Biol. 2009;48(12):1219-24.
12. Mansouri Sh, Safa A, Gholamhoseinian Najar S, Gholamhoseinian Najar A. Inhibitory activity of Iranian plant extracts on growth and biofilm formation by Pseudomonas aeruginosa. Mal J Microbiol. 2013;9(2):176-83.
13. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. Clin Microbiol Rev. 1999;12(4):564-82.
14. Androw JM. Standardized disc susceptibility testing method. J Antimicrob Chem. 2001; 48(Suppl 1):43-57.
15. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Truck N. Antimicrobial susceptibility testing by a standardized single disk method. Am J Clin Pathol. 1966;45(4):493-6.
16. Finegold SM, Baron EJ, Bailey WR. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology: Methods for testing antimicrobial effectiveness. 8th ed. Mosby, St. Louis, MO; 1990. p.171-94.
17. Vanden DA, Vlietinck AJ. Screening medthods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. In: Methods in plant biochemistry. 5th ed. London:Academic press;1991.p:47-69.
18. Cramton SE, Gerke C, Cotz F. In vitro methods to study biofilm formation. Methods Enzymol. 2001; 336:239-55.
19. Jabra-Rizk MA, Meiller TF, James CE, Shirtliff ME. Effect of Farnesol on Staphylococcus aureus biofilm formation and antimicrobial susceptibility. Antimicrob Agents Chemother. 2006;50(4):1463-9.
20. Mahdavi M, Kasra Kermanshahi R, Jalali M. The assessment of disinfectants on various bacterial biofilms. Res J Univ Isf "SCI". 2008;31(2):35-46. [In Persian]
21. Nostro A, Bisignano G, Angela Cannatelli M, Crisafi G, Paola Germanò M, Alonzo V. Effects of Helichrysum italicum extract on growth and enzymatic activity of Staphylococcus aureus. Int J Antimicrob Agents. 2001;17(6):517-20.
22. Myszka K, Czaczyk K. Bacterial biofilms on food contact surfaces-a review. Pol J Food Nutr Sci. 2011; 61(3):173-80.
23. Tekwu EM, Pieme AC, Beng VP. Investigations of antimicrobial activity of some Cameroonian medicinal plant extracts against bacteria and yeast with gastrointestinal relevance. J Ethnopharmacol. 2012;142(1):265-73.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1393.17.1.10.3]
[DOI: 10.22088/jbums.17.1.77]