

مقایسه اثر ضد میکروبی 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 می‌شود. این مطالعه خواص ضد میکروبی عصاره‌های 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 دایلوژن محاسبه شد. اثرات ضد بیوفیلمی در سه غلظت ۵ mg/ml، ۱۰ mg/ml و ۲۰ mg/ml با روش میکروتیتر پلیت بررسی گردید. سه شاخص میزان تشکیل بیوفیلیم، تخریب بیوفیلیم 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، پseudomonas 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 عصاره‌ها ساختارهای بیوفیلمی را حداقل به میزان ۵۰ درصد و حداکثر ۹۵ درصد از بین بردند. اثر مهار عصاره به غلظت و نوع حلال آن وابسته است. بیشترین اثر مهار در پدیده تشکیل بیوفیلیم بر باکتری استفیلوکوکوس ارئوس (۹۵/۸۴٪) بوده و pseudomonas 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.

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

واژه‌های کلیدی: بیوفیلیم، گیاه انار، باکتری پاتوژن، مقاومت دارویی، اثر ضد میکروبی.

مقدمه

مقاومت یک میکروارگانیسم به ترکیبات ضد میکروبی دلایل مختلفی دارد که قرارگیری در ساختاری به نام بیوفیلیم یکی از مهم‌ترین علل آن محسوب می‌شود. بیوفیلیم‌ها اجتماعات سازمان یافته‌ای از سلول‌های میکروبی محصور در ماتریکسی از پلیمرهای خارج سلولی اند که بر هر سطح در تماس با رطوبت می‌توانند تشکیل شوند (۱). گسترش بیوفیلیم‌ها بر سطح تجهیزات پزشکی و صنعتی مشکلات بسیاری را به دنبال دارد. میکروارگانیسم‌های مولد بیوفیلیم 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 (۳و۴). گیاه انار با نام علمی *Punica granatum* و متعلق به خانواده *Punicaceae* می‌باشد. در طب سنتی از میوه انار به منظور برطرف نمودن نارشاهی‌های 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 (۵و۶). 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 می‌باشد.

* مسئول مقاله: دکتر مهدی حسن شاهیان

آدرس: کرمان، دانشگاه شهید باهنر کرمان، دانشکده علوم، بخش زیست‌شناسی. تلفن: ۰۳۴-۳۳۲۲۲۰۳۲

E-mail: mshahi@uk.ac.ir

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 مهارتی عصاره‌های تهیه شده از پوست انار بر باکتری‌های گرم مثبت استافیلوکوکوس ارئوس، باسیلوس سرئوس و استرپتوکوکوس پنومونیه و همچنین باکتری‌های گرم منفی پseudomonas aeruginosa، اشرشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه انجام شد. استافیلوکوکوس ارئوس، اشرشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه سویه‌های جداسازی شده از بیماران بوده و از آزمایشگاه میکروبی‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی کرمان تهیه شدند. باسیلوس سرئوس سویه جدا سازی شده از دام بوده و از دانشکده دامپزشکی دانشگاه باهنر تهیه گردید. پseudomonas aeruginosa نیز سویه جدا شده 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 مهارتی 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 (۱۰۰ mg/ml) 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 (۳۰ µg/disc) 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) رقیق گردید. از این سوسپانسیون‌ها به کمک سوآب استریل در محیط مولر هینتون آگار کشت سفره‌ای 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 مهارتی 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)

کوئرتستین (Quercetin)، کامپفرول (Kaempferol)، ۱۷-آلفا استرادیول، استرون، استریول، گاماتوکوفرول و بسیاری که ترکیبات شیمیایی دیگر که اغلب پتانسیل ضد میکروبی 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 پseudomonas aeruginosa را به خوبی مهار می‌کند. همچنین در این بررسی مشخص شد که اثربخشی عصاره‌های اتانولی از انواع دیگر بهتر بوده و قدرت مهارتی عصاره با غلظت آن رابطه مستقیم دارد (۸).

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

همچنین در مطالعه دیگری مشخص گردید که عصاره‌های پوست انار از تشکیل بیوفیلیم در باکتری پseudomonas aeruginosa ممانعت می‌نمایند (۱۲). اگر چه پیش از این مطالعاتی بر خواص ضد میکروبی پوست انار انجام شده است اما اغلب این بررسی‌ها بر فرم منفرد میکروارگانیسم‌ها بوده و به ساختارهای بیوفیلیمی توجه کمتری شده است. با توجه به این نکته و مشکلات ناشی از تشکیل بیوفیلیم‌های میکروبی در صنعت و پزشکی و به منظور دستیابی به ترکیبات موثر در مقابله با این ساختارها، این مطالعه به منظور بررسی خواص مهارتی عصاره‌های الکلی پوست انار بر فرم منفرد و ساختارهای بیوفیلیمی شش باکتری پاتوژن شامل سه باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس ارئوس، باسیلوس سرئوس و استرپتوکوکوس پنومونیه و سه باکتری گرم منفی پseudomonas aeruginosa، 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 کاملاً بسته شد. به منظور بهبود فرآیند عصاره‌گیری، ارلن‌ها به دستگاه شیکر با سرعت ۱۸۰ دور در دقیقه و دمای ۳۸

دمای اتاق خشک گردید. جذب نوری هر چاهک پس از افزودن ۱۶۰ میکرولیتر اسید استیک گلاسیال ۳۳ درصد با دستگاه الیزا 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):

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

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 (۵-۲۰ mg/ml) 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 (۵-۲۰ mg/ml) 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 (۲۲و۲۳).

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

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

در ابتدا ده غلظت ۵۰-۰/۲ mg/ml 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 ۵۰ mg/ml 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 ۲۵ mg/ml 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 (۲ mg/ml)، لوله‌های کنترل منفی حاوی سوسپانسیون میکروبی و آب مقطر استریل و نهایتاً 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 هیتون اگر 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 تیترو 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 ۵-۲۰ mg/ml 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).

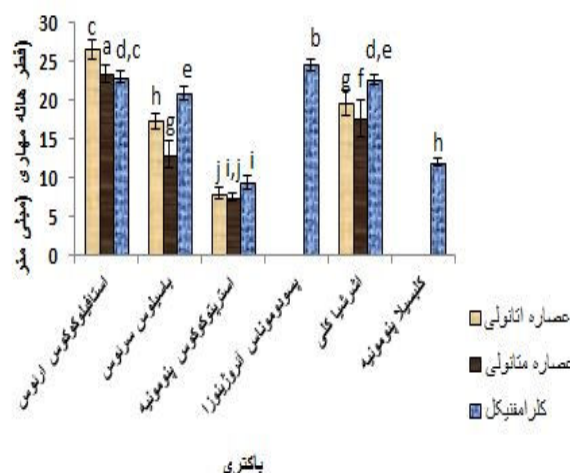
اثر مهاری غلظت‌های مختلف عصاره پس از انکوباسیون به کمک رنگ آمیزی کریستال ویوله تعیین شد. برای این منظور محتویات هر چاهک به آرامی آسپیره و سپس دو مرتبه با بافر سالین فسفات شسته شد. پس از این ۱۵۰ میکرو-لیتر متانول به مدت ۱۵ دقیقه جهت تثبیت ساختارهای بیوفیلمی به چاهک‌ها افزوده گردید. بعد از آسپیره متانول، 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

یافته‌ها

قابلیت مهاري 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 ۰/۲ 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 مهاري مربوط به دیسک عصاره‌های پوست انار بر باکتری‌های مورد مطالعه را نشان داده و مقادیر MIC و MBC عصاره‌های 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 مهاري باکتری‌های استافیلوکوکوس ارئوس، باسیلوس سرئوس و اشرشیاکلی را به خوبی مهار کردند. میانگین قطر هاله مهاري ایجاد شده بر این باکتری‌ها به ترتیب ۲۵ mm، ۱۵/۱۵ mm و ۱۸/۶۵ mm می‌باشد ($p < 0/01$). برخلاف این عصاره‌های پوست انار قادر به ایجاد هاله مهاري بر باکتری‌های استرپتوکوکوس پنومونیه، پسودوموناس آئروژینوزا و کلبسیلا پنومونیه نبودند و از این‌رو قابلیت مهاري 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 مهاري انواع متانولی عصاره در آزمون MIC بیشتر از انواع اتانولی است به جز باکتری اشرشیاکلی که انواع متانولی و اتانولی عصاره با قدرت برابری قادر به مهار این باکتری بوده و همچنین استرپتوکوکوس پنومونیه و کلبسیلا پنومونیه که قابلیت مهاري انواع اتانولی عصاره بر آن‌ها بیشتر است. بیشترین اثر مهاري در آزمون MIC از عصاره‌ی اتانولی پوست انار بر باسیلوس سرئوس و کمترین اثر مهاري نیز از عصاره‌ی اتانولی گیاه مذکور بر پسودوموناس آئروژینوزا مشاهده شد (جدول ۱).

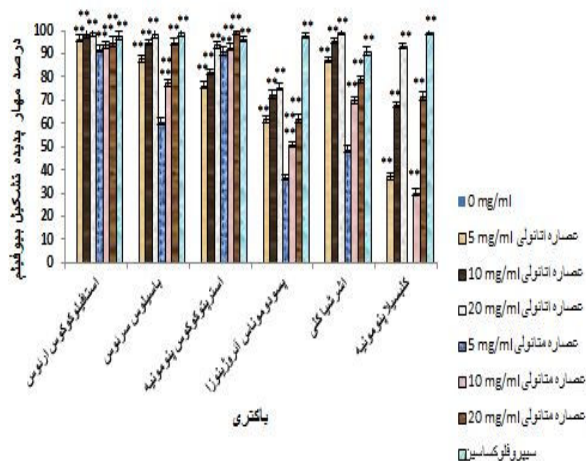


نمودار ۱. مقایسه قطر هاله مهاري عصاره‌های پوست انار و آنتی‌بیوتیک شاهد (mm). حروف مشابه a, b, c, ... بر هر ستون بر اساس آزمون Duncan بوده و نشان می‌دهد که این مقادیر با یکدیگر در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌دار ندارند

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

باکتری	MIC عصاره متانولی	MIC عصاره اتانولی	MBC عصاره متانولی	MBC عصاره 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
اشرشیاکلی	۰/۱۹	۰/۱۹	۱/۵۶	۰/۷۸
کلبسیلا پنومونیه	۰/۷۸	۱/۵۶	۱/۵۶	۱/۵۶

قابلیت عصاره‌های گیاهی در مهار ساختارهای بیوفیلیم: قدرت مهاري هریک از غلظت‌های انتخابی عصاره‌های پوست انار در مهار پدیده تشکیل بیوفیلیم، تخریب ساختارهای بیوفیلیم 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 بیوفیلیمی نشان دادند. بر این اساس در آزمون‌های انجام شده بر ساختارهای بیوفیلیمی، نوع باکتری، نوع حلال و غلظت عصاره بر قابلیت مهاري آن موثر است. غلظت هر عصاره با اثرگذاری آن رابطه مستقیم داشته و با افزایش غلظت، اثر مهاري نیز افزایش می‌یابد. اثرگذاری هریک از این پارامترها بر قدرت مهاري عصاره معنی‌دار می‌باشد ($p < 0/01$) (نمودار ۲).



نمودار ۲. مقایسه اثر مهاري غلظت‌های متفاوت عصاره‌های الکلی پوست انار بر تشکیل بیوفیلیم باکتری‌های انتخابی. * نشان‌دهنده مهار معنی‌دار پدیده تشکیل بیوفیلیم در تیمار با آن غلظت ($p < 0/05$) و ** نشان‌دهنده مهار معنی‌دار پدیده تشکیل بیوفیلیم در تیمار با آن غلظت ($p < 0/01$)

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

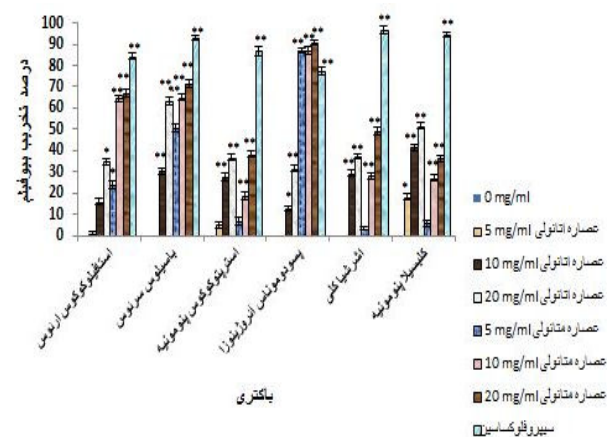
بحث و نتیجه گیری

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 مهاریه 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 ضد میکروبی موجود در عصاره‌های مذکور همانند بسیاری از عصاره‌های گیاهی دیگر، قابلیت ضعیفی در انتشار در محیط جامد داشته و در محیط مایع کارآمدترند.

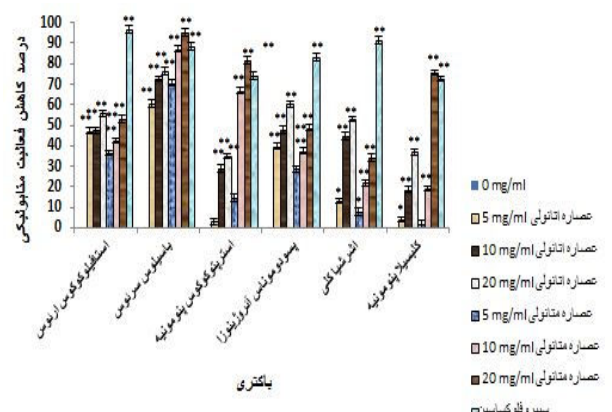
مقادیر MIC عصاره‌های مذکور در محدوده غلظتی ۰/۰۹-۳/۱۲ mg/ml و مقادیر MBC در بازه غلظتی ۰/۳۹-۱۲/۵ mg/ml به دست آمد که این مقادیر خود موید قابلیت مهاریه مناسب این گیاه می‌باشد. همچنین بیشتر بودن مقادیر MBC نسبت به MIC نشانگر خاصیت باکتریواستاتیکی عصاره‌های پوست انار است. در بررسی‌های دیگر نیز قابلیت مهاریه عصاره‌های اجزاء مختلف گیاه انار بر میکروارگانیسم‌های پاتوژن تایید شده است. برای مثال Abdollahzadeh و همکاران اثر مهاریه 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 ۸، ۱۲، ۴۰ mg/ml بر باکتری مذکور اثر داده شده و قطر هاله‌های به دست آمده به ترتیب ۷/۵، ۱۱/۵، ۱۲/۵ می‌باشد (۷). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که با افزایش غلظت عصاره، قطر هاله مهاریه نیز افزایش می‌یابد. عصاره‌های تهیه شده در مطالعه Abdollahzadeh 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 Abdollahzadeh و همکاران پودر پوست انار به مدت ۳۰ روز در متانول باقی مانده و حلال مرتباً جایگزین شده است که همین می‌تواند قدری از اجزاء موثره عصاره را کاهش داده باشد.

در مطالعه دیگر، Pai و همکاران قابلیت مهاریه 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 مهاریه بیشتری نسبت به انواع آبی عصاره دارند که به شیوه جوشاندن به دست آمده می‌آیند. افزایش اثر مهاریه 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 پیش‌رو با توجه به تفاوت در سویه‌های 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 کاملاً مشابه با این مطالعه انجام شده است. در این مطالعه اثر بخشی این عصاره‌ها بر فرم منفرد سه سویه بالینی استافیلوکوکوس ارئوس، اشرشیاکلی و پseudomonas آئروژینوزا تایید گردید. قطر

در مهار پدیده تشکیل بیوفیلم معنی‌دار است ($P < 0/01$). در این آزمون بیشترین اثر مهاریه در باکتری استافیلوکوکوس ارئوس (۹۵/۸۴٪) و کمترین اثر مهاریه بر تشکیل بیوفیلم کلبسیلا پنومونیه (۵۰/۱۴٪) مشاهده شد. در تخریب ساختارهای بیوفیلمی، بیوفیلیم‌های pseudomonas آئروژینوزا حساس‌ترین (۵۱/۴۸٪) و استرپتوکوکوس پنومونیه (۲۲/۲۱٪) مقاوم‌ترین ساختارها را تشکیل دادند. فعالیت متابولیکی بیوفیلیم‌ها نیز در تیمار با عصاره‌های پوست انار به حد قابل توجهی 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 ($P < 0/01$) (نمودار ۳ و ۴).



نمودار ۳. مقایسه قابلیت غلظت‌های متفاوت عصاره‌های الکلی پوست انار در حذف ساختارهای بیوفیلمی باکتری‌های انتخابی. * نشان‌دهنده تخریب موثر ساختارهای بیوفیلمی در تیمار با آن غلظت ($P < 0/05$) و ** نشان‌دهنده تخریب موثر ساختارهای بیوفیلمی در تیمار با آن غلظت ($P < 0/01$)



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 ($P < 0/05$) و ** نشان‌دهنده مهار معنی‌دار فعالیت آنزیم دهیدروژناز در تیمار با آن غلظت ($P < 0/01$)

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 ۲۱، ۲۲/۵ 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 کاملاً 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 بیوفیلیمی نیز بسیار کارآمد بودند. اثر مهاری عصاره‌ها با غلظت رابطه مستقیم داشته و اثربخشی هر عصاره به نوع حلال وابسته است. قابلیت عصاره‌های انتخابی در مهار پدیده تشکیل بیوفیلم تمامی باکتری‌ها بیشتر از قدرت آن‌ها در تخریب ساختارهای بیوفیلیمی است. میزان تخریب ساختارهای بیوفیلیمی 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 بیوفیلیمی 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 بیوفیلیمی انجام می‌شود. با توجه به اینکه ترکیبات موثره عصاره‌های پوست انار و مکانیسم اثر مهاری آن‌ها بر ساختارهای بیوفیلیمی 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 ضدبیوفیلیمی گیاه انار توجه کمتری شده و بررسی‌های انجام شده بیشتر با تمرکز بر پدیده کتوروم سنسینگ بوده اند که نقش مهمی در تشکیل ساختارهای بیوفیلیمی دارد. در مطالعه Mansouri و همکاران قابلیت عصاره‌های متانولی پوست انار در مهار کتوروم سنسینگ در شش سویه از باکتری پسودوموناس آئروژینوزا تایید شده و این عصاره‌ها تولید کلنی‌های موکوتیدی را نیز در این باکتری مهار می‌کنند (۱۲).

از این رو 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 اساس آن‌ها و عصاره‌های قسمت‌های مختلف گیاه انار، ترکیبات مذکور گزینه‌های مناسبی در مهار فرم منفرد و ساختارهای بیوفیلیمی میکروارگانیسم‌های پاتوژن می‌باشند. از این رو بررسی بیشتر به منظور شناسایی مکانیسم اثربخشی عصاره‌های مذکور بر ساختارهای بیوفیلیمی برای دستیابی به یک منبع ضد میکروبی مناسب در مقابله با میکروارگانیسم‌های پاتوژن به ویژه در شکل بیوفیلیمی 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 می‌گردد.

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, pseudomonas 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

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. Kargioglul 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, Hane 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, Shirliff ME. Effect of Farnesol on *Staphylococcus aureus* biofilm formation and antimicrobial susceptibility. Antimicrob Agents Chemother. 2006;50(4):1463-9.
20. Mahdavi M, Kasma 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. Myszk K, Czaczky 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.