مجله دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران (پیاورد سلامت)
دوره ۱۲ شماره ۳ مرداد و شهریور ۱۳۹۷، ۱۹۲-۱۸۳

مقاله پژوهشی

بررسی تاثیرات عصاره‌ی هیدرومتانولی پوست انار بر روی باکتری‌های *استافیلوکوک اورئوس* و *اشریشیاکلی* به روش میکروپلیت در شرایط آزمایشگاهی

احسان استبرقی[۱]، مجید صادق پور[۲]، امیر مهربانی[۳]

دریافت مقاله : دی ۱۳۹۶
پذیرش مقاله : اردیبهشت ۱۳۹۷

* نویسنده مسئول :
مجید صادق پور؛
دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی

Email :
magid_sadeghpoor@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: پوست انار حاوی مقادیر زیادی از ترکیبات آنتی باکتریال و آنتی اکسیدان می‌باشد. با افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری *اشریشیاکلی* به عنوان عامل اساسی در عفونت ادراری و *استافیلوکوک اورئوس* عامل عفونت‌های مقاوم به درمان، نیاز جدی به درمان جایگزین و یا ترکیباتی که مقاومت کمتری از خود نشان دهند، احساس می‌شود. هدف، بررسی خواص آنتی باکتریال عصاره‌ی انار و ممانعت کننده از مقاومت آنتی بیوتیکی عصاره برعلیه باکتریهای پاتوژن می‌باشد.

روش بررسی: پس از جمع آوری پوست تازه‌ی انار آنها را در مکانی به دور از نور خورشید و در سایه برای مدت ۷۲–۴۸ ساعت خشک کرده و عصاره‌گیری به روش خیساندن(ماسیراسیون Maceration) صورت گرفت، در بررسی میزان حداقل غلظت (رقت) مهارکننده از محیط مولرهینتون براث و برین هارت اینفیوژن آگار (Brain Heart Infusion Agar :BHI) استفاده شد. در روش چاهک(میکرودایلوشن) میزان کدورت حاصل، ارزیابی گردید.

یافته‌ها: نتایج حاصل از آزمون میکرودایلوشن نشان داد که حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC: Minimum Inhibitory Concentration) برابر با رقت ۱/۸ به میزان ۲۵ میکرولیتر از عصاره‌ی انار برای باکتری *اشریشیاکلی* و باکتری *استافیلوکوک اورئوس* حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC) برابر با رقت ۱/۱۶ به میزان ۱۲/۵ میکرولیتر از عصاره‌ی انار است.

نتیجه گیری: عصاره‌ی استخراج شده از پوست انار در شرایط ذکر شده بیشترین خاصیت ضدمیکروبی را در مقایسه با سایر موارد دارد. این عصاره با بیشترین اثر ضدمیکروبی بر روی *استافیلوکوک اورئوس* از باکتری‌های گرم مثبت و در مقابل *اشریشیاکلی* که شاخص آلودگی مدفوعی به شمار می رود نیز کاملا موثر است. در نهایت *استافیلوکوک اورئوس* بیشترین حساسیت را به این عصاره از خود نشان داد.

واژه های کلیدی: پوست انار، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیاکلی*، MIC

۱ دکتری تخصصی میکروبیولوژی، گروه دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهربابک، شهربابک، ایران
۲ کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه بیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران
۳ کارشناس ارشد بهداشت مواد غذایی، گروه دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-17]

مقدمه

گیاهان دارویی امروزه در درمان بیماری‌های مختلف استفاده می‌شوند. درمان بیماری‌ها با عصاره‌های گیاهی به زمان‌های خیلی دور برمی‌گردد. پذیرش گیاهان دارویی به عنوان درمان جایگزین در بسیاری از بیماری‌ها و نیز افزایش روزافزون مقاومت آنتی بیوتیکی، پژوهشگران را ترغیب به بررسی خواص ضدمیکروبی برخی گیاهان دارویی کرده است(۱).

گیاه انار دارای خواص ضدباکتریایی و ضدقارچی است که در این راستا می‌تواند بر علیه طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها اثرات قابل توجهی داشته باشد. میزان اثر ضدمیکروبی این گیاه در گونه‌های مختلف از لحاظ قدرت و طیف اثر متفاوت است. نحوه‌ی استخراج، گونه‌ی گیاه، موقعیت جغرافیایی، استرس‌های وارد شده به گیاه، تفاوت های درون گونه ای بر میزان و نوع ترکیبات شیمیایی گیاه موثر می‌باشند. بر طبق شواهد موجود، انار، بومی ایران و کشورهای همجوار آن است که این گیاه از خانواده Punicaceae و متعلق به دون خانواده Pomegranate بوده و نام علمی آن Punica granatum L. است(۲).

اسید الاژیک به عنوان یکی از ترکیبات بسیار فعال زیستی موجود در انار برای مطالعات گوناگون در نظر گرفته شده که از هیدرولیز الاژی‌تانن‌ها نظیر پونیکالاژین، آن را می‌توان در انار پیدا کرد. پس از مصرف آب میوه انار یا عصاره آن، اسید الاژیک وارد دستگاه گوارش و سپس گردش خون شده و در بدن منتشر می شود. هیدرولیز الاژی تانن‌ها به دنبال انتشار اسید الاژیک بوده و نیازی به واکنش آنزیمی ندارد بلکه این هیدرولیز وابسته به pH محیط می‌باشد و میزان مطلوب اسیدیته آن برابر با ۸ خواهد بود. حداکثر انتشار الاژی تانن‌ها در محتویات سکوم(روده بزرگ) بوده و پس از گذشت یک ساعت در خون قابل مشاهده و ردیابی است(۴و۳).

اسید الاژیک در عصاره‌ی پوست انار وجود دارد و تاثیرات بسزایی را روی میکروارگانیسم های مختلف می‌گذارد. در مورد ترکیب های فنولیک و به خصوص پونیکالاژین (Punicalagin) به دست آمده از پوست انار، گزارش هایی وجود دارد که بیانگر خاصیت ضدمیکروبی و ضدقارچی در شرایط in vitro و in vivo می‌باشد(۵).

باکتری *اشریشیاکلی* (E.coli) از اعضای خانواده‌ی انتروباکتریاسه بوده و از باسیل‌های گرم منفی و بدون اسپور است. بیشترین گونه باسیل گرم منفی شایع در فلور مدفوعی، *اشریشیاکلی* بوده که این باکتری گونه متنوعی است و توانایی کلونیزه شدن و پایداری در میزبانهای حیوانی، انسانی و محیط را دارد. عفونت مجاری ادراری ناشی از این باکتری یکی از شایعترین عفونتهای باکتریایی و دومین عفونت شایع و از علل عمده‌ی مراجعه‌ی بیماران به بیمارستانهاست. از بین عوامل باکتریال یوروپاتوژن در بیماران سرپایی و بستری، *اشریشیاکلی* شایعترین عامل است که بین ۷۵ تا ۹۰ درصد در موارد عفونت ادراری جدا شده است(۶).

در سال ۱۸۸۵، اولین بار Escherich این باکتری را در مدفوع افراد سالم پیدا کرد. اشریشیاکلی از مهمترین عوامل عفونی باکتریایی اتیولوژیک اسهال است. علاوه بر ایجاد عفونتهای خارج روده‌ای، شش دسته از اشریشیاکلی های بیماریزای روده‌ای شناسایی شده است که بیماریزایی پنج گونه از آنها برای انسان به اثبات رسیده است که عبارتند از: Enterotoxygenic (ETEC)، Enteropathogenic (EPEC)، Enterohaemorrhagic (EHEC)، Diffuse-adhering (DAEC)، Enteroinvision (EIEC) و Enteroaggregative (EAEC) که سویه‌های *اشریشیاکلی* Enteroaggregative عامل ایجاد اسهال حاد و مزمن و اسهال پایدار در کودکان می‌باشند(۷).

استافیلوکوکوس اورئوس از خانواده میکروکوکاسه و این خانواده شامل جنس‌های دیگری مانند میکروکوکوس و پلانوکوکوس نیز می‌باشد. این باکتری‌ها کوکسی شکل، گرم مثبت و کاتالاز مثبت که هم متابولیسم اکسیداتیو و هم متابولیسم تخمیری دارند. جنس *استافیلوکوک* دارای بیش از ۲۷ گونه و ۷ زیرگونه که شایع‌ترین گونه‌ی آن که اغلب عامل بیماری *استافیلوکوکی* می‌باشد، *استافیلوکوک* طلایی است. باکتری ها روی سطح پوست سر و صورت به صورت میکروکلونی بوده، مجرای خروجی گوش، بخش قدامی سوراخ‌های بینی، نواحی مرطوب و چین‌دار پوست، محل‌های مناسب استقرار *استافیلوکوک‌ها*ست. بیوفیلم در *استافیلوکوک‌ها* از ترکیبات خارج سلولی است که به مقادیر متنوعی در همه آنها تولید می شود و بیوفیلم‌ها رابطه تنگاتنگی با عوامل ژنتیکی، گونه و شرایط رشد دارند. مهمترین سویه‌های *استافیلوکوکی* تولیدکننده‌ی بیوفیلم به ترتیب شامل: *استافیلوکوک اپیدرمیدیس*، *استافیلوکوک کاپیتیس* زیرگونه‌ی *اوره کاپیتیس*، *استافیلوکوک کاپیتیس* زیرگونه‌ی *کاپیتیس*،

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-17]

استافیلوکوک هومینیس، *استافیلوکوک همولیتیکوس* و *استافیلوکوک وارنری* هستند(۹و۸).

اوّلین مورد MRSA (Methicillin Resistant Staphylococcus Aureus) در اواسط دهه‌ی ۷۰ میلادی گزارش شد و بتدریج درصد آن افزایش یافت که اکثراً از بیمارستان ها و خانه سالمندان جدا می‌شد. ریسک فاکتورهای کلونیزاسیون و عفونت با MRSA شامل مصرف آنتی بیوتیک، تماس با فردی که با MRSA کلونیزه دارد، جراحی و بستری در ICU بود. این افراد اکثراً هیچ گونه خطر خاصی که منجر به عفونت با MRSA شود و یا تماس با افرادی که در بیمارستان ها شاغل بوده اند نداشته اند. اختلافی که MRSA بیمارستانی با CA-MRSA دارد در این است که CA-MRSA به دیگر آنتی بیوتیک هایی که روی استافیلوکوک تاثیر دارند، اکثراً حساسند نظیر(کلیندامایسین، اریترومایسین، کوتریموکسازول، کینولون ها، ریفامپین) اما MRSA بیمارستانی نسبت به اکثر این آنتی بیوتیک ها مقاوم می‌باشند(۱۱و۱۰).

باکتریهایی که این نوع مقاومت را داشته باشند MRSA بوده و مقاومت به متی سیلین به میزان MIC>۴ برای اگزاسیلین و برای متی‌سیلین MIC>۱۶ مشاهده می‌شود. این نوع مقاومت کروموزومال بوده و در آن ژن mecA موجب ایجاد تغییراتی در PBP2a شده که این تغییر منجر به کاهش میل ترکیبی PBP (Affinity) برای بتالاکتام ها می شود. برای تشخیص این نوع از میکروارگانیسم ها می‌توان توسط PCR، ژن mecA را شناسایی کرد و از داروهای انتخابی مانند ونکومایسین و یا تئیکوپلانین(گلیکوپپتیدها) استفاده نمود(۱۲). هدف، بررسی خواص آنتی باکتریال عصاره‌ی انار و ممانعت کننده از مقاومت آنتی بیوتیکی عصاره بر علیه باکتریهای پاتوژن می‌باشد.

روش بررسی

• **تهیه عصاره‌ی متانولی:** عصاره‌گیری به روش ماسیراسیون (خیساندن Maceration) صورت گرفت. به این ترتیب که پس از جمع آوری پوسته‌ی تازه انار آنها را در مکانی به دور از نور خورشید و در سایه، محلی که جریان ملایم هوا در گذر بود، برای مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت خشک شد و سپس مقدار معینی با ترازو وزن شد که ۱۰۶ گرم از پوست خشک شده نیمه خرد شد و در ۵۰۰ سی سی متانول ۸۰ درصد به مدت ۷۲ ساعت در مکان تاریکی خیسانده شد و در نهایت با کاغذ صافی واتمن ۴۲ محلول عصاره صاف شد. به کمک دستگاه روتاری با مارک (IKA) حلال مورداستفاده یعنی متانول را از عصاره جداسازی و پس از تغلیظ عصاره، جهت انجام آزمایش داخل یخچال نگهداری شد(۱۳).

• **تهیه سوسپانسیون‌های میکروبی استاندارد:** سویه های باکتری مورداستفاده به صورت استاندارد از مرکز پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران(مرکز کلکسیون میکروارگانیسم های صنعتی ایران) (IROST) تهیه و خریداری شد.

برای بررسی میزان حداقل غلظت(رقت) مهارکننده از محیط مولر هینتون براث و برین هارت اینفیوژن آگار (BHI: Brain Heart Infusion Agar) استفاده شد که در روش چاهک(میکرودایلوشن) میزان کدورت حاصل ارزیابی گردید. در کلیه مراحل همواره کنترل مثبت و منفی در چاهک انتهایی در نظر گرفته شد. سویه استاندارد باکتری‌ها شامل: سویه استاندارد باکتری *اشریشیاکلی* (PTCC ۱۳۹۹) یا (ATCC ۲۵۹۲۲) و سویه استاندارد باکتری *استافیلوکوک اورئوس*(PTCC ۱۴۳۱) یا (ATCC ۲۵۹۲۳) استفاده شد. برای تمام مراحل آزمون حساسیت میکروبی از غلظت معادل نیم مک فارلند(۱۰۸× ۱/۵) جهت انجام آزمایشها استفاده شد.

اشریشیاکلی بر روی محیط مک کانکی آگار، کلنی‌های ارغوانی ایجاد می‌کند؛ زیرا باکتری لاکتوز مثبت است و قند را تخمیر کرده و اسید تولید می‌کند. اسید موجب کاهش pH در محیط آگار مک کانکی شده و در نتیجه رنگ ارغوانی ایجاد می‌شود. همین اتفاق نیز در محیط EMB (Eosin Methylene Blue) رخ داده و کلنی‌های ارغوانی تیره با جلای سبز فلزی ایجاد می‌کند. باکتری در محیط TSI به صورت اسید/اسید و با تولید گاز و H2S منفی و از نظر تست IMViC به صورت اندول مثبت، MR مثبت، VP منفی و سیترات منفی است. باکتری *استافیلوکوک اورئوس* بر روی محیط بلاد آگار و برد پارکر آگار کشت شد و از کلنی های رشد کرده بر روی این محیط‌ها استفاده گردید(۱۴).

• **تعیین حداقل غلظت بازدارندگی رشد به روش میکرودایلوشن:** جهت بررسی میزان حداقل غلظت(رقت) مهارکننده و میزان حداقل غلظت(رقت) کشنده باکتری‌ها از محیط کشت‌های بلاد آگار، مولر هینتون براث، برین هارت اینفیوژن

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-17]

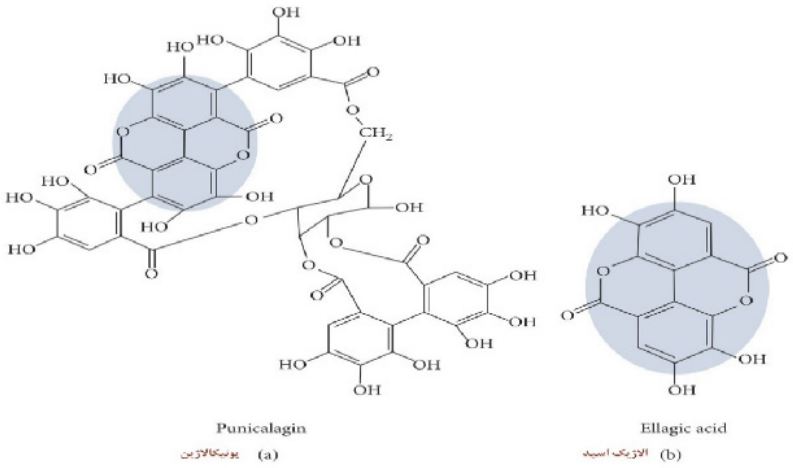
آگار (BHI) استفاده شد. در این تکنیک ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت مولر هینتون براث در تمام چاهک‌ها (Well) وارد کرده و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره‌ی پوست انار را به چاهک ابتدایی افزوده و اقدام به رقت سازی نموده تا به خانه دهم رسیده و به همان اندازه مقدار ابتدایی خارج نمود. در مرحله‌ی بعد ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی به تمام چاهک‌ها اضافه می گردد. کنترل مثبت حاوی سوسپانسیون میکروبی به همراه محیط کشت و کنترل منفی حاوی محیط کشت به همراه عصاره پوست انار است. در ادامه به بررسی میزان حداقل غلظت(رقت) کشنده باکتری‌ها پرداخته و از گوده‌ی چهارم تا گوده‌ی هشتم باکتری *استافیلوکوک اورئوس* را در روی پلیت بلاد آگار کشت می‌گردد. جهت بررسی باکتری *اشریشیاکلی* از گوده‌ی سوم تا پنجم، بر روی محیط کشت برین هارت اینفیوژن آگار (BHI) انجام می شود تا با توجه به رشد کلنی بتوان این مقادیر را ارزیابی کرد (۱۴).

یافته ها

ترکیبات فنلی موجود در پوست انار از طریق چند مکانیسم مختلف، خاصیت ضدمیکروبی را ایجاد می‌کنند. ترکیبات فنولی قادرند با پروتئینهای سلولی میکروارگانیسم‌ها واکنش داده و در ساختار و عملکرد دیواره سلولی تغییر ایجاد کنند و یا باعث دناتوراسیون برخی آنزیمهای میکروبی شوند. علاوه بر آن ترکیبات فنلی با برخی مواد مغذی محیط مانند کربوهیدراتها، پروتئین‌ها، ویتامین‌ها و مواد معدنی تشکیل کمپلکس داده و آنها را از دسترس میکروارگانیسم‌ها خارج می‌کند.

شکل ۱: ردیف اول حاوی باکتری *اشریشیاکلی* و ردیف دوم شامل *استافیلوکوک اورئوس* که غلظت ممانعت کنندگی از رشد در چاهک به خوبی قابل مشاهده است. در گوده شماره ۴ ردیف اول عدم رشد باکتری *اشریشیاکلی* و باکتری *استافیلوکوک* در ردیف دوم گوده شماره ۵ عدم رشد مشهود است.

همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود و بر اساس نتایج حاصل از آزمون میکرودایلوشن نشان داده که در باکتری گرم منفی *اشریشیاکلی* از چاهک شماره ۴ رشد باکتری آغاز شده بنابراین غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC) برابر با رقت ۱/۸ یعنی به میزان ۲۵ میکرولیتر از عصاره انار می باشد. این نتایج در مورد باکتری *استافیلوکوک اورئوس* بدین صورت است که از چاهک شماره ۵ رشد باکتری آغاز شده بنابراین غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC) برابر با رقت ۱/۱۶ یعنی به میزان ۱۲/۵ میکرولیتر از عصاره انار می باشد. در تمام مراحل انجام آزمایش کنترل مثبت و کنترل منفی در نظر گرفته شد.



شکل ۲: ترکیب موثر با ساختار فنولیک در پوست انار(۵)

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-17]

ساختار شیمیایی فوق(شکل ۲) ترکیب مهمی است به نام اسید الاژیک که در عصاره پوست انار وجود داشته و این ماده با وزن مولکولی ۳۰۲/۱۹ دالتون و فرمول شیمیایی آن به صورت C14H6C8 تاثیرات بسزایی بر روی میکروارگانیسمهای مختلف دارد. پونیکالژین از ترکیبات مهم دیگری است که از انار جدا شده و با فعالیت ضدمیکروبی خود در برابر میکروارگانیسم ها تاثیرات بسزایی را نشان می دهد؛ جالب توجه آنکه در شرایط آزمایشگاهی اسید الاژیک را می توان به داخل سلول وارد نمود و برای انجام این فرآیند، پس از انکوباسیون با تانن برگ انار انتقال اسید الاژیک صورت می‌گیرد که نفوذپذیری غشا با تغییراتی در کلسترول غشای سلولی در ارتباط است(۱۶و۱۵).

بحث

استفاده از گیاهان دارویی از گذشته های دور در سنت ملل مختلف جهت درمان بیماریها رواج داشته است. اغلب اسانس ها و عصاره ها به عنوان منبع ترکیبات آنتی میکروبیال از گیاهان خاص و بومی منطقه تامین می‌شده است(۱۷). بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه عصاره پوست انار به طور موثر خاصیت مهارکننده ای نسبت به باکتری *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوک اورئوس* دارد و این نتیجه از قرائت میکروپلیت استفاده شده و چاهک‌هایی که عدم رشد داشتند به دست آمده است.

در توافق با نتایج حاضر، Smaill و Vazquez بیان کردند که انار، گیاه شناخته شده ای در طب قدیم است و اثرات مختلف آن شناخته و مشخص شده است، به طوری که تمدن‌های کهن مصر، هند، چین و یونان این گیاه دارویی را شناخته بودند. مهمترین اثراتی که برای انار در کتب سنتی عنوان شده، خاصیت قابض، ضدانگل، ضدسرطان ، ضددیابت، ضدقارچ، ضدباکتری آن است(۱۸).

در توافق با نتایج حاضر، Meier و همکاران نشان دادند که الاژی تانن موجود در انار، اثرات ضدمیکروارگانیسمی در حدود هفت روز روی باکتری هایی نظیر *اشریشیاکلی*، *کلبسیلا*، *سودوموناس*، *باسیلوس*، *پروتئوس*، *استافیلوکوکوس* و قارچ هایی نظیر(کاندیدا و کریپتوکوکوس) اعمال می‌نماید و کاملا اثرگذار است(۱۹).

Khayyat با بررسی عصاره متانولی انار که دارای فعالیت وسیع الطیف ضدمیکروبی است، نشان داد که این گیاه در برابر ۱۵۹ نوع باکتری مولد عفونت ادراری جدا شده از بیماران با سنین و جنسیت متفاوت و نیز در برابر چندین نوع باکتری مقاوم نسبت به داروها بسیار موثر عمل می‌نماید(۲۰).

بر اساس مدلی که Shanmugam و همکاران در سال ۲۰۱۱ ارایه دادند، کاهش مقاومت آنتی بیوتیکی توسط متابولیت های گیاهی مختلف و طی مکانیسمهای خاص انجام می پذیرد. با در نظر گرفتن این مطلب که انار غنی از آنتی اکسیدانهای قوی پلی فنولیک، تانن، پونیکالاژین، آنتوسیانین، الاژیک اسید، گالیک اسید و فلاونوئید می‌باشد، احتمال می رود اسید گالیک و پونیکالاژین موجود در عصاره‌ی پوست انار، می تواند از طریق مکانیسم کاهش نفوذ، اثر افزایش دهندگی حساسیت آنتی بیوتیکی پوست انار را توجیه کند(۲۱). در این تحقیق آزمایشگاهی (in vitro) اثرات ضدمیکروبی عصاره پوست انار از روش میکرودایلوشن مورد ارزیابی قرار گرفت. ترکیبات فنولیک مختلف اثرات مختلفی روی غشای *استافیلوکوک اورئوس* دارند که می توان نتیجه گرفت این ترکیبات فنولیک احتمالاً یک سازوکار مشترک ندارند و ممکن است که هدف های مختلفی در ارتباط با اثر ضد میکروبی آنها وجود داشته باشد.

به گفته‌ی Perez و Anesini، عصاره‌ی پوست انار دارای فعالیت قوی ضد باکتری در برابر مقاومت چندگانه سالمونلا تیفی و نظایر آن است. در طب سنتی آرژانتین فعالیت ضدمیکروبی علیه سالمونلا تیفی را که از جوشاندن عصاره های آبی از بین ۱۳۲ گیاه معمولی به دست می آید گزارش کرده بودند. در نتیجه با استفاده از روش انتشار آگار نتیجه خوبی دربرداشت و دارای غلظت مرجع با منحنی پاسخ دهی برای مقایسه قدرت آمپی سیلین موردارزیابی قرار گرفت. در نتیجه عصاره پریکارپ گیاه Punica granatum دارای فعالیت خوب، مناسب و آشکاری بر روی نمونه‌ها بود(۲۲).

Voravuthikunchai و همکاران بیان کردند که عصاره آبی و اتانولی Punica granatum را برای انجام آزمایش آنتی باکتریال فعالیت مهار رشد در باکتری *اشریشیاکلی* برای مرحله اول با روش انتشار دیسک دیفیوژن بررسی نمودند که علیه سویه های مختلف نیزاستفاده گردید. در این میان گیاهان دارویی آزمایش شده با روش رقت سازی در ظروف petri با فیلتر میلی پور، عصاره آبی انار Punica granatum در برابر *اشریشیاکلی* O157: H7 بسیار موثر افتاد که با بهترین حداقل غلظت مهاری (MIC) حداقل غلظت کشنده باکتری (MBC) به ترتیب برابر با ۰/۰۹، ۰/۷۸ و ۰/۱۹، ۰/۳۹ میلی گرم/میلی لیتر می‌باشد(۲۳).

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-17]

در مطالعه جداگانه ای از Menezes و همکاران بیان شد که عصاره‌ی هیدروالکلی (HAE = Hydroalcoholic extract) از Punica granatum در برابر میکروارگانیسم های پلاک دندان (In vivo) بسیار موثر یافت شد و تعداد واحدهای تشکیل دهنده کلنی در هر میلی لیتر (CFU/ml) در مقایسه با گروه شاهد ۸۴٪ کاهش یافت. این نتایج نشان داد که HAE ممکن است با کاهش ۱۱٪ جایگزین مناسبی برای درمان پلاک دندان باشد(۲۴).

Hayrapetyan و همکاران(۲۰۱۲) نشان دادند که عصاره استخراجی از پوست انارهای قرمز رنگ که دارای آنتوسیانین بالاتری هستند، نسبت به عصاره‌ی پوست انارهای صورتی رنگ که مقدار آنتوسیانین آنها کمتر است خاصیت ضد میکروبی قوی تری مشاهده گردید(۲۵).

Braga و همکاران، خواص متنوع انار را بررسی کردند و مشخص شد که با تاثیر غلظت های مختلف از عصاره انار بر باکتری *استافیلوکوک اورئوس* FRI 722 می‌توان بر رشد و تولید انتروتوکسین تاثیر گذاشت. با روش رقت لوله و تولید انتروتوکسین و مشخص شدن آن به کمک صفحات آگار غشایی (Membrane agar plates) در غلظت‌های عصاره کم به اندازه‌ی ۰/۰۱٪ =v/v اثر بر رشد باکتری یا به تاخیر انداختن رشد بود، این در حالیست که در غلظت بالاتر معادل ۱٪ =V/V از عصاره، رشد باکتریایی متوقف می گردد. در غلظت ۰/۰۵٪ =V/V عصاره‌ی انار از تولید انتروتوکسین استافیلوکوک (SE) جلوگیری می‌کند(۲۶).

به تازگی در تحقیق Rahnemoon و همکاران مشاهده شد که *استافیلوکوک اورئوس* حساسیت مناسبی را نسبت به عصاره پوست انار از خود نشان می‌دهد و قطر هاله‌ی عدم رشد در روش انتشار دیسک بین ۹ تا ۱۸/۶۶ میلی متر است. در باکتریهای مورد مطالعه *اشریشیاکلی* بیشترین مقاومت را نسبت به عصاره‌های استخراج شده از پوست انار نشان داد. باکتریهای گرم منفی نسبت به عصاره‌های گیاهی مقاومت بیشتری در مقایسه با باکتریهای گرم مثبت نشان می‌دهند. در مورد قارچ های *آسپرژیلوس نایجر* و *ساکارومایسس سرویزیه* نیز خاصیت ضدمیکروبی نشان داد که با یافته های Alzorky در سال ۲۰۰۹ مطابقت دارد(۲۷).

باکتریهای گرم منفی علاوه بر لایه پپتیدوگلیکان دارای یک غشای خارجی در دیواره سلولی خود می‌باشند. مولکولهای لیپوپلی ساکاریدی موجود در سطح غشا و خاصیت هیدروفیلی آن مقاومت این سلولها را در برابر آنتی بیوتیک‌ها و مواد آنتی باکتریال افزایش می‌دهد. در حالی‌که در باکتریهای گرم مثبت ترکیبات ضدمیکروبی به راحتی دیواره سلولی و غشای سیتوپلاسمی را تحت تاثیر قرار می‌دهند. اسیدهای فنولیک شامل کلروژنیک، کلروفیل، سیرینژیک، سیناپیک، پتاسیم، کوماریک، فورولیک، وانیلیک، ellagic، گالیک و کادمیوم اسید که در PoP (Pomegranate peel) (منبع ارزشمند ترکیبات زیست فعال مانند اسید فنولیک است) شناسایی شده است. ترکیبات فنولی و غلظت آنها متفاوت است. در میان ارقام انار که در جغرافیای متفاوت رشد می کنند مقادیر متفاوت اسید گالیک، ellagic، caffeic و p-coumaric شناسایی شدند و در PoPx از ۶ اکوتایپ انار تونسی با میانگین غلظت های ۱۲۳، ۷۹، ۳۵، ۸۹، ۲۰، ۵۶، ۴ و ۴۸ به ازای هر ۱۰۰ mg/gr، به طور خاص است (۲۹و۲۸).

هاله‌ی عدم رشد ایجاد شده توسط پنی سیلین در مورد تمامی میکروارگانیسم‌های مورد تحقیق کوچکتر از هاله‌ی عدم رشد تشکیل شده توسط قویترین عصاره‌ی ضدمیکروبی استخراج شده از پوست انار است. رنگ پوست یک عامل کلیدی است که بر قابلیت اثرگذاری میوه ها تأثیر می گذارد. بنابراین، کشف مکانیزم ژنتیکی تنظیم رنگ پوست میوه ممکن است برای پرورش دهندگان علاقه مند به تولید ارقام انار جدید مفید باشد. با افزایش رنگ میوه ها در نتیجه، رشد پوست میوه موضوع مورد علاقه در میان محصولات به طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته است. پنی سیلین از اولین آنتی بیوتیکهای مورد استفاده بر علیه باکتریها به ویژه *استافیلوکوکها* و استرپتوکوکها بود اما امروزه به دلیل استفاده بیش از حد بسیاری از میکروارگانیسمها نسبت به این آنتی بیوتیکها مقاومت پیدا کرده اند(۳۱و۳۰).

با توجه به اثرات جانبی و هزینه‌ی زیاد داروهای شیمیایی، مطالعه بر روی گیاهان مورد استفاده در طب سنتی با هدف رسیدن به پیشرفت بیشتر در علم پزشکی در اولویت قرار گرفته است. گیاهان دارویی دارای مواد طبیعی هستند که احتمال عوارض جانبی آن ها کمتر است. بسیاری از این گیاهان دارای منابع غنی از آنتی اکسیدانهای طبیعی هستند که می توانند اثرات ناشی از اکسیدان ها یا عوارض برخی از بیماریها را کاهش دهند. ترکیبات اسانس فنلی بوده و در

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-17]

جلوگیری از تشکیل بیوفیلم باکتری‌ها و قارچهای پاتوژن از اهمیت بالایی برخوردار است. در غلظت زیاد، عصاره اثر فوری بر روی عملکرد بیوفیلم‌ها دارد و نشان داده که قدرت نابودکنندگی زیادی دارد. این فعالیت همچنین با خاصیت ممانعت کنندگی از اتصال و چسبیدن میکروارگانیسم به سطوح پلی استرن همراه است. بنابراین عصاره می‌تواند با موفقیت زیادی از تشکیل پلاک بر روی سطح دندان جلوگیری نماید. مهار استرپتوکوکوس موتانس در چسبیدن به مناطق مختلف برای تشکیل بیوفیلم را با غلظت‌های کمتر از MIC از این عصاره که حاوی فلاونوئیدها و تانن‌هاست می‌توان انجام داد. این عصاره با داشتن فلاونوئیدهای شناخته شده‌ی خود که خاصیت ضدگلیکوترانسفرازی دارند، انتقال ترکیبات قندی را مهار می‌کنند.

در پایان متذکر می شود که استفاده‌ی اینگونه از ترکیبات به طور موضعی قابل قبول و پذیرش بوده اما کاربرد سیستمیک جهت درمان عفونتهای داخلی بسیار محدود و با رعایت تمامی استانداردهای دارویی باید صورت گیرد.

نتیجه گیری

با توجه به اینکه گیاه انار مقاوم بوده و دارای توانایی رشد در شرایط سخت و نامساعد می‌باشد کشت آن به صورت مقادیر انبوه امکان پذیر و اقتصادی است. همچنین می‌توان با انتخاب گونه‌هایی که دارای تولید مواد موثر بیشتری هستند امکان افزایش تاثیرات بیشتری از این گیاه را فراهم نمود. این عصاره بیشترین اثر ضدمیکروبی را بر روی باکتری *استافیلوکوک اورئوس* از باکتریهای گرم مثبت دارد و در مقابل باکتری *اشریشیاکلی* که شاخص آلودگی مدفوعی(کلی فرم) به شمار می‌رود، نیز کاملا موثر است. در نهایت *استافیلوکوک اورئوس* به عنوان شاخص باکتری‌های مثبت مقاوم به درمان بیشترین حساسیت را به این عصاره از خود نشان می دهد. پس از بررسی نتایج و ارزیابی به دست آمده پیشنهاد می گردد تا روشهای متفاوت استخراج در مورد این گیاه مورد مقایسه قرار گیرد تا بهترین روش و بهترین حلال مشخص گردد. در مورد اثرات زیستی این گیاه به نظر می‌رسد که باید تحقیقات بیشتری صورت گیرد.

منابع

1. Oz AT. Effects of harvests date and conditions of storage of 'Hayward' kiwifruits on contents of L-ascorbic acid. Journal of Food Agriculture & Environment 2010; 8(2): 242-4.

2. Geerlings SE & Hoepelman AI. Immune dysfunction in patients with Diabetes Mellitus (DM). Pathogens and Disease 1999; 26(3-4): 259-65.

3. Chang FY & Shaio MF. Respiratory burst activity of monocytes from patients with non-insulin-dependent Diabetes mellitus. Diabetes Research and Clinical Practice 1995; 29(2): 121-7.

4. Joshi N, Caputo GM, Weitekamp MR & Karchmer A. Infections in patients with diabetes mellitus. New England Journal of Medicine 1999; 341(25): 1906-12.

5. Carlton PS, Kresty LA & Stoner GD. Failure of dietary lyophilized strawberries to inhibit 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-and benzo [a] pyrene-induced lung tumorigenesis in strain A/J mice. Cancer Letters 2000; 159(2): 113-7.

6. Brooks G, Carroll KC, Butel J & Morse S. Jawetz, Melnick, & Adelberg's medical microbiology. 26th ed. USA: McGraw Hill Professional; 2012: 723-860.

7. Persing DH, Tenover FC, Hayden R, Ieven M, Miller M, Nolte F, et al. Molecular microbiology: Diagnostic principles and practice. 3rd ed. USA: American Society for Microbiology (ASM); 2016: 56-71.

8. Carroll KC, Butel J & Morse S. Jawetz, Melnick, & Adelberg's medical microbiology. 27th ed. USA: McGraw Hill Professional; 2015: 235-47.

9. Murray P, Rosenthal K & Pfaller M. Medical microbiology. 8th ed. Poland: Elsevier Health Sciences; 2015: 658-69.

10. García-Álvarez L, Holden MT, Lindsay H, Webb CR, Brown DF, Curran MD, et al. Meticillin-resistant Staphylococcus aureus with a novel mecA homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: A descriptive study. The Lancet Infectious Diseases 2011; 11(8): 595-603.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-17]

11. Köck R, Becker K, Cookson B, Van Gemert-Pijnen J, Harbarth S, Kluytmans J, et al. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA): Burden of disease and control challenges in Europe. Eurosurveillance 2010; 15(41): 19688.

12. Liu C, Bayer A, Cosgrove SE, Daum RS, Fridkin SK, Gorwitz RJ, et al. Clinical practice guidelines by the infectious diseases society of America for the treatment of methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections in adults and children. Clinical Infectious Diseases 2011; 52(3): e18-e55.

13. Davidson PM, Sofos JN & Branen AL. Antimicrobials in food. 3rd ed. USA: CRC press; 2005: 25-36.

14. Mahon CR, Lehman DC & Manuselis G. Textbook of diagnostic microbiology. 5th ed. Poland: Elsevier eBook on VitalSource; 2015: 532-620.

15. Burapadaja S & Bunchoo A. Antimicrobial activity of tannins from Terminalia citrina. Planta Medica 1995; 61(04): 365-6.

16. Monteiro D, Silva S, Negri M, Gorup L, de Camargo E, Oliveira R, et al. Silver colloidal nanoparticles: Effect on matrix composition and structure of C andida albicans and C andida glabrata biofilms. Journal of Applied Microbiology 2013; 114(4): 1175-83.

17. Sadeghpour M & NoorBakhsh F. The effect of hydro-peel (Pomegranate peel) on blood biochemical parameters in Diabetic rats infected with Candida Albicans. Journal Of Zanjan University Of Medical Sciences and Health Services 2016; 24(104): 83-93 [Article in Persian].

18. Smaill F & Vazquez JC. Antibiotics for asymptomatic bacteriuria in pregnancy. Cochrane Database of Systematic Reviews 2007; 2(2): 456-69.

19. Meier M, Kaiser T, Herrmann A, Knueppel S, Hillmann M, Koester P, et al. Identification of urinary protein pattern in type 1 Diabetic adolescents with early Diabetic nephropathy by a novel combined proteome analysis. Journal of Diabetes and its Complications 2005; 19(4): 223-32.

20. Khayyat H. Essential oil compositions of Artemisia scoparia waldst. et. Kit native to north east of Iran. Advances in Environmental Biology 2010; 4(2): 254-7.

21. Shanmugam S, Annadurai M & Rajendran K. Ethnomedicinal plants used to cure diarrhoea and dysentery in Pachalur hills of Dindigul district in Tamil Nadu, Southern India. Journal of Applied Pharmaceutical Science 2011; 1(8); 94-97.

22. Perez C & Anesini C. In vitro antibacterial activity of Argentine folk medicinal plants against Salmonella typhi. Journal of Ethnopharmacology 1994; 44(1): 41-6.

23. Voravuthikunchai S, Lortheeranuwat A, Jeeju W, Sririrak T, Phongpaichit S & Supawita T. Effective medicinal plants against enterohaemorrhagic Escherichia coli O157: H7. Journal of Ethnopharmacology 2004; 94(1): 49-54.

24. Menezes SM, Cordeiro LN & Viana GS. Punica granatum (Pomegranate) extract is active against dental plaque. Journal of Herbal Pharmacotherapy 2006; 6(2): 79-92.

25. Hayrapetyan H, Hazeleger WC & Beumer RR. Inhibition of Listeria monocytogenes by Pomegranate (Punica granatum) peel extract in meat paté at different temperatures. Food Control 2012; 23(1): 66-72.

26. Braga L, Shupp J, Cummings C, Jett M, Takahashi J, Carmo L, et al. Pomegranate extract inhibits Staphylococcus aureus growth and subsequent enterotoxin production. Journal of Ethnopharmacology 2005; 96(1-2): 335-9.

27. Rahnemoon p, Sarabi JM, Javanmard DM, Bostan A. Evaluation of extraction conditions on phenolic compounds and antimicrobial properties of Pomegranate (Punica Granatum) peels. Iranian Journal of Food Science and Technology 2017; 14(65): 159-68[Article in Persian].

28. Duffy CF & Power RF. Antioxidant and antimicrobial properties of some Chinese plant extracts. International Journal of Antimicrobial Agents 2001; 17(6): 527-9.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-17]

29. Singh B, Singh JP, Kaur A & Singh N. Phenolic compounds as beneficial phytochemicals in Pomegranate (Punica granatum L.) peel: A review. Food Chemistry 2018; 261(1): 75-86.

30. Watkins PB & Seeff LB. Drug-induced liver injury: Summary of a single topic clinical research conference. Hepatology 2006; 43(3): 618-31.

31. Luo X, Cao D, Li H, Zhao D, Xue H, Niu J, et al. Complementary iTRAQ-based proteomic and RNA sequencing-based transcriptomic analyses reveal a complex network regulating Pomegranate (Punica granatum L.) fruit peel colour. Science Reports 2018; 8(1): 12362.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-17]

Study of Pomegranate Hydromethanol Extract on *Staphylococcus Aureus* and *Escherichia Coli* by Microplate in Laboratory Conditions

Ehsan Estabraghi[1] (Ph.D.) - Majid Sadeghpour[2] (M.S.)
Amir Mehrabani[3] (M.S.)

1 Ph.D. in Microbiology, Veterinary Medicine Department, School of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Shahr-e-Babak Branch, Shahrbabak, Iran

2 Master of Science in Microbiology, Biology Department, School of Basic Sciences, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran

3 Master of Science in Food Microbiology, Veterinary Medicine Department, School of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Shahr-e-Babak Branch, Shahrbabak, Iran

Abstract

Received: Dec 2017
Accepted: Apr 2018

Background and Aim: Pomegranate skin contains large amounts of antibacterial and antioxidant compounds. Increasing antibiotic resistance in *Escherichia coli* bacteria as a major contributor to urinary tract infections and Staphylococcus aureus is a cause of resistance to treatment-resistant infections, a serious need for alternative therapies or compounds that exhibit less resistance. The aim of this study was to investigate the antibacterial properties of Pomegranate extract and inhibit antibiotic resistance of the extract against pathogenic bacteria.

Materials and Methods: After collecting fresh Pomegranate skin, they were dried in a place of sunlight and in shade for 48-72 hours and extraction was done by maceration, in order to determine the minimum level of exposure (Dilution) inhibitor was used from the Muller Hinton Broth and Brain heart Infusion Agar (BHI: Bullet Hit Indicator). The resulting turbidity was measured in a well solution (microdilution).

Results: The results of microdilution test showed that the growth inhibitory concentration (MIC: Minimum Inhibitory Concentration) was equal to dilution of 1.8 to 25 µL from Pomegranate extract for E. coli and Staphylococcus aureus bacteria. The growth inhibitory concentration (MIC) was equal to a dilution of 1.16 times 12.5 µL of Pomegranate extract.

Conclusion: The extract extracted from Pomegranate skin has the most antimicrobial properties in comparison with other cases. This extract has the most antimicrobial effect on Staphylococcus aureus bacteria from gram-positive bacteria and against E. coli bacteria that is an indicator of fecal contamination. Finally, *Staphylococcus aureus* showed the highest susceptibility to this extract.

Keywords: Pomegranate Peel, *Staphylococcus Aureus, Escherichia Coli,* MIC

*** Corresponding Author:**
Sadeghpour M
Email:
magid_sadeghpoor@yahoo.com

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-17]