مقاله پژوهشی

بررسی تاثیر عصاره هیدروالکلی پوست انار بر روی تشکیل بیوفیلم حاصله از باکتری سودوموناس آئروجینوزا

دکتر رضا حبیبی پور*، لیلا مرادی حقگو**

دریافت: ۹۴/۱/۳۰ پذیرش: ۹۴/۵/۲۴

چکیده:

مقدمه و هدف: میکروارگانیسم ها می توانند در اثر عوامل مختلف به دور یکدیگر جمع شده و تشکیل توده زیستی به نام بیوفیلم را دهند که باعث افزایش مقاومت آنها نسبت به شرایط نامساعد محیطی و بیوسایدها می شود. از استراتژی های مقابله با بیوفیلم استفاده از ترکیبات مختلف گیاهی است. ثابت شده که عصاره گیاهانی همچون انار، تمشک و اسانس بابونه دارای اثر ضدبیوفیلمی می باشند. این مطالعه با هدف تعیین اثر غلظت های مختلف عصاره پوست انار بر روی تشکیل بیوفیلم باکتری سودوموناس آئروجینوزا انجام گرفت.

روش کار: در این مطالعه تجربی میزان اثر ضد بیوفیلمی، میزان درصد کاهش تشکیل بیوفیلم و کینتیک رشد باکتری سودوموناس آئروجینوزا در تیمارهای مختلف به روش میکروتیتر پلیت و رنگ سنجی با کریستال ویوله اندازه گیری شد. همچنین میزان تشکیل بیوفیلم به روش میکروسکوپی نیز مورد بررسی قرار گرفت. تجزیه و تحلیل آماری داده های بدست آمده حاصل از قرائت دستگاه الایزا با نرم افزار SPSS در سطح ۰/۰۵ انجام شد.

نتایج: یافته ها نشان داد که در تمامی تیمارها در شش ساعت اول باکتری قادر به تولید بیوفیلم نبوده است. میزان بیوفیلم تشکیل شده در تیمار ۱۲ ساعت غلظت های g/mL ۰/۰۱و ۰/۰۵ متوسط بود. در تیمارهای ۱۸ و ۲٤ ساعته غلظت g/mL ۰/۰۰۱ عصاره پوست انار به ترتیب تاثیر بازدارندگی تشکیل بیوفیلم متوسط و قوی مشاهده شد.

نتیجه نهایی: نتایج این مطالعه نشان داد که مدت زمان در معرض قرار گرفتن باکتری ها با تشکیل بیوفیلم و درصد کاهش تشکیل بیوفیلم رابطه مستقیمی دارد که می تواند ناشی از فازهای متفاوت رشدی باشد. مطالعه کینتیک رشدی نیز مشخص کرد که در اکثریت تیمارها تا زمان حدود ۱۵ ساعت رشد افزایشی و پس از آن به دلیل تاثیر گذاری تیمارهای متفاوت به صورت کاهشی بوده است. تیمارها پس از ۱۸ ساعت بیشترین تاثیر را در تشکیل بیوفیلم داشته اند. در همین راستا نتایج درصد کاهش تشکیل بیوفیلم نیز نشان داد که در ۱۸ ساعت بیشترین کاهش رخ داده است. نتایج اسلایدهای میکروسکوپی نیز کاملا تأیید کننده موارد فوق بوده است.

کلید واژه ها: انار / بیوفیلم / سودوموناس آئروژینوز / کینتیک رشد

مقدمه:

در طبیعت اغلب باکتری ها تمایل دارند که به صورت متصل به سطوح جامد (بر روی بافت های نرم زنده یا سطوح غیر زنده، مواد غوطه ور و یا ذرات خاک) رشد کنند. ارتباط و پیوستگی میکروارگانیسم ها با سطوح جامد منجر به تشکیل لایه ای می گردد که به نام بیوفیلم میکروبی شناخته می شود. بیوفیلم متشکل از اجتماع میکروارگانیسم هایی است که روی یک سطح و در درون عموماً بوسیله یک ماتریکس از مواد پلیمری آلی با منشا میکروبی (عموماً پلی ساکارید، پروتئین و یا نوکلئیک اسید) تثبیت شده اند. بیوفیلم می تواند از یک گونه و یا مخلوطی از چند گونه تشکیل شده باشد (۱).

ثابت شده است که در اغلب میکروارگانیسم ها هدف از تشکیل بیوفیلم حفاظت میکروارگانیسم در مقابل شرایط

* استادیار گروه میکروبیولوژی دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد همدان، همدان، ایران (habibipour@iauh.ac.ir)

** کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد همدان، همدان، ایران

Archive of SID

www.SID.ir

سخت محیطی، سیستم ایمنی میزبان، باکتریوفاژها، مواد شیمیائی مضر همانند آنتی بیوتیک های طبیعی و جذب مواد مغذی می باشد (۲،۳). اخیراً به دلیل تفاوت رفتاری میکروارگانیسم ها از لحاظ فیزیولوژی و بیماری زائی فرم موجود در بیوفیلم یک میکروارگانیسم نسبت به فرم آزاد (پلانکتونیک) توجهات خاصی به این مقوله شده است (۴).

تشکیل بیوفیلم در گونه‌های مختلف باکتری ها از جمله Enterobacter، Bacillus، Flavobacterium، Alcaligenes،Staphylococcus و Pseudomonas مشاهده شده‌است. سودوموناس آئروجینوزا یک باسیل گرم منفی هوازی اجباری است، که در فلور طبیعی پوست و دستگاه گوارش انسان، آب و خاک به وفور یافت می شود. این باکتری پاتوژنی فرصت طلب است که به عنوان یکی از مهمترین عوامل عفونت های بیمارستانی در طیف وسیعی از بیماران دارای نقص سیستم ایمنی شامل مبتلایان به بدخیمی ها، سیستیک فیبروزیس، سوختگی ها و... شناخته شده است. این باکتری دارای مقاومت زیادی نسبت به اکثر آنتی بیوتیک ها می باشد که در برخی از موارد این ویژگی با تشکیل بیوفیلم ارتباط مستقیمی دارد. (۵،۶).

مطالعات زیادی ثابت نموده اند که استفاده از عصاره گیاهان داروئی از جمله استراتژی های بسیار موفق و کاربردی در کنترل شکل گیری و توسعه بیوفیلم می باشد. تحقیقات چند دهه اخیر ثابت کرده است که انار (درختی که موطن اصلی آن ایران است) به دلیل دارا بودن مقادیر زیادی از پلی فنل ها، محتوی آنتی اکسیدان های مهمی است که دارای اثر ضدمیکروبی می باشد (۷). عصاره هیدرالکلی انار بر روی کاهش تشکیل دندان تأثیر مثبتی داشته است و همچنین ثابت شده است که ژل های درمانی حاوی عصاره انار توانسته است باعث کاهش میزان اتصال سویه های استافیلوکوک و در نتیجه میزان تشکیل بیوفیلم شوند (۳). در بررسی انجام شده بر روی عصاره انار بر روی بیوفیلم قارچ کاندیدا آلبیکنس مشخص شد که تیمار این قارچ با ریزذرات اسپری شده با عصاره انار تأثیرگذار می باشد (۸).

باتوجه به موارد فوق الذکر در این مطالعه از پوست میوه انار بعنوان منبع غنی مواد ضد میکروبی استفاده شد تا میزان تأثیر ضد بیوفیلمی آن بر روی باکتری سودوموناس آئوروجینوزا مشخص گردد.

روش کار:

کشت باکتری: باکتری سودوموناس آئروجینوزا مورد استفاده در این مطالعه تجربی به صورت لیوفیلیزه شده با کد PTCC: 1430 از انستیتو پاستورایران خریداری گردید. تحت شرایط استریل و طبق دستورالعمل باکتری در سرم فیزیولوژی حل گردید و پس از گذشت یک ساعت داخل محیط کشت نوترینت براث کشت گردید.

نمونه برداری و عصاره گیری: برای انجام آزمایشات از میوه‌های درختان انار پوست سیاه کلکسیون مرکز تحقیقات ساوه در تیر ماه سال ۱۳۹۲ نمونه برداری شد. پوست میوه ها خشک شده و سپس پودر گردید. به منظور تهیه عصاره هیدروالکلی ۵۰ گرم از پودر پوست ا نار به مدت ۷۲ ساعت در ۵۰۰ میلی لیتر الکل ۷۰٪ در دمای اتاق خیسانده شد. جهت تغلیظ و خشک نمودن عصاره‌ها پس از سانتریفیوژ با کمک دستگاه تبخیرکننده در خلا چرخشی تا حد ممکن تغلیظ گردید. سپس عصاره های حاصله به دستگاه آون منتقل و در درجه حرارت ۴۰ درجه سانتیگراد بطور کامل خشک گردید. به منظور تهیه عصاره در غلظت های مختلف ۱ گرم از پودر عصاره در ده میلی لیتر آب دو بار تقطیر حل و با فیلتر میلی پور ۰/۴۵ میکرونی صاف گردید. با استفاده از محاسبات نسبتی رقیق سازی جهت تهیه محلول عصاره با غلظت های ۰/۰۵، ۰/۰۱، ۰/۰۰۵ و ۰/۰۰۱ گرم در میلی لیتر با آب دو بار تقطیر انجام شد (۹).

بررسی تأثیر عصاره پوست انار برروی تشکیل بیوفیلم: به منظور اندازه گیری میزان اثر ضد بیوفیلمی از روش میکروتیتر پلیت و رنگ سنجی با کریستال ویوله استفاده شد (۱۰،۱۱). روش اندازه گیری میزان تأثیر ضد بیوفیلمی عصاره انار به این صورت بود که ابتدا ۱۸۰ میکرولیتر از محیط کشت تریپتیک سوی براث(TSB) داخل چاهک‌های میکروتیترپلیت ۹۶چاهکی ازجنس پلی استایرن ریخته شد. چاهک اول محیط کشت بدون عصاره به عنوان شاهد مثبت در نظرگرفته شد. در چاهک های بعدی ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت های مختلف عصاره پوست انار (در سه تکرار) به محیط کشت اضافه گردید. یک چاهک هم به عنوان شاهد منفی بدون عصاره و باکتری در نظر گرفته شد. در مرحله بعد از کشت۲۴ ساعته باکتری سودوموناس برروی محیط نوترینت براث سوسپانسیونی معادل نیم مک فارلند تهیه شد و ۲۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون به

Archive of SID

www.SID.ir

همه چاهک ها به جز چاهکی که به عنوان شاهد منفی در نظر گرفته شده بود اضافه گردید. میکروتیترپلیت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شد. بعد از۲۴ ساعت محتویات داخل چاهک ها به آرامی با برگرداندن خالی شده و تمامی چاهک ها سه بار با بافر فسفات شستشو داده شدند تا تمامی باکتری های پلانکتونیک حذف گردند. میکروتیترپلیت در دمای اتاق خشک گردید. در مرحله بعد با اضافه کردن ۲۰۰ میکرولیتر متانول به هرچاهک باکتری های متصل به سطح داخلی دیواره چاهک ها، که همان جمعیت بیوفیلمی می باشند تثبیت شد. بعد از ۱۵ دقیقه متانول چاهک ها را دور ریخته و پلیت در درجه حرارت اتاق خشک گردید. به منظور رنگ آمیزی به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر کریستال ویوله ۰/۱٪ به مدت ۵ دقیقه اضافه شد. سپس رنگ اضافی بطور کامل توسط جریان ملایم آب شسته شد و میکروتیترپلیت در دمای اتاق خشک گردید. بعد از این مرحله برای سنجش میزان رنگ متصل شده به دیواره، که نمایانگر میزان بیوفیلم می باشد، به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر استیک اسید گلاسیال ۳۳٪ اضافه شده، چند بار با سمپلر به خوبی هم زده شد تا رنگ های متصل به چاهک که بیان گر میزان تشکیل بیوفیلم می باشد به خوبی حل گردد. پس از یکنواخت شدن محلول هر چاهک میزان جذب در ۶۳۰ نانومتر توسط دستگاه الایزا قرائت گردید.

بررسی کینتیک تشکیل بیوفیلم: سوسپانسیون سلولی معادل $۱/۲ \times ۱۰^{۸}$ از باکتری کشت شده ۱۶ ساعته بر روی محیط کشت نوترینت براث تهیه شد. جهت بررسی کینتیک تشکیل بیوفیلم تیمارهای مرحله قبل تحت شرایط کاملاً مشابه مجدداً تکرار گردید (۱۲). میکروپلیت های تیمار شده مشابه در زمان های ۶، ۱۲، ۱۸ و ۲۴ ساعت به روش توضیح داده شده فوق شسته و قرائت گردیدند. بدین ترتیب اثر هر یک از تیمارها بر روند تشکیل بیوفیلم در این چهار بازه زمانی نشان دهنده کینتیک رشد می باشد.

مشاهده بیوفیلم تشکیل شده با میکروسکوپ: محیط کشت TSB به میزان ۵۰ میلی لیتر در جارهای رنگ آمیزی استریل ریخته شد. ۱۰ میلی لیتر از غلظت های مختلف عصاره انار داخل هر جار ریخته و به هر جار یک میلی لیتر از باکتری سودوموناس با غلظت نیم مک فارلند اضافه گردید. پس از تلقیح جارها به مدت ۲۴ ساعت دردمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شدند. پس از این مدت اسلایدهای شیشه ای به آرامی در محلول بافر فسفات استریل فروبرده شد. سپس همانند آزمون به روش میکروپلیت مرحله تثبیت به مدت ۱۵ دقیقه با متانول انجام شد. رنگ آمیزی ساده با کریستال ویوله ۰/۱٪ به مدت ۵ دقیقه صورت گرفت. در نهایت اسلایدها جهت مطالعات میکروسکوپی با بزرگنمائی ۱۰۰۰ مشاهده شد (۱۳).

تجزیه و تحلیل داده ها

سنجش میزان تشکیل بیوفیلم: وضعیت تشکیل بیوفیلم در چاهک ها نیز طبق فرمول زیر محاسبه گردید که در آن ODC میانگین جذب نوری چاهک های کنترل و ODTمیانگین جذب نوری چاهک های تیمار می باشد (۱۴).

عدم تشکیل بیوفیلم= $OD \leq ODC$

قدرت تشکیل بیوفیلم ضعیف = $ODC < OD \leq (2 \times ODC)$

قدرت تشکیل بیوفیلم متوسط =$(2 \times ODC) < OD \leq (4 \times ODC)$

قدرت تشکیل بیوفیلم قوی = $(4 \times ODC) < OD$

سنجش درصد کاهش تشکیل بیوفیلم: سنجش کارائی ترکیب ضد میکروبی یا درصد کاهش بیوفیلم را می توان از طریق جذب نوری چاهک های تیمار شده، کنترل و شاهد با توجه به رابطه زیر محاسبه نمود که در این رابطه ODC میانگین جذب نوری چاهک های کنترل، ODB میانگین جذب نوری چاهک های شاهد و ODT میانگین جذب نوری چاهک های تیمار شده است (۱۵).

% کاهش میزان بیوفیلم = $[((ODC - ODB) - (ODT - ODB)) / (ODC - ODB)] \times 100$

آنالیزهای آماری: آزمون آماری مورد استفاده از نوع تحلیل واریانس مختلف بود، مقایسه میانگین تیمارهای متفاوت با استفاده از آزمون دانکن توسط نرم افزار IBM SPSS Statistics version 22 در سطح ۰/۰۵ انجام شد.

نتایج:

بررسی تأثیر عصاره پوست انار برروی تشکیل بیوفیلم: همان گونه که در جدول۱ مشخص شده است در تمامی تیمارهای مجزا در شش ساعت اول باکتری قادر به تولید بیوفیلم نبوده است. در زمان ۶ ساعت نمونه کنترل مثبت قادر به تشکیل بیوفیلم نبوده است، در حالیکه نمونه های

Archive of SID

www.SID.ir

کنترل مثبت در تیمارهای ۱۲، ۱۸ و ۲۴ ساعت بیوفیلم بسیار زیادی تشکیل داده اند که بعنوان نمونه های دارای قدرت تشکیل بیوفیلم قوی شناخته شده است.

جدول۱ : نتایج آنالیز نوع بیوفیلم تشکیل شده در تیمارهای مختلف عصاره پوست انار در زمان های ۶، ۱۲، ۱۸ و ۲۴ ساعت

	۶ ساعت	۱۲ ساعت	۱۸ ساعت	۲۴ ساعت
کنترل مثبت (غلظت صفر)	NB	SB	SB	SB
(g/mL)۰/۰۰۱PPE	NB	SB	WB	SB
(g/mL) ۰/۰۰۵PPE	NB	SB	NB	MB
(g/mL) ۰/۰۱PPE	NB	MB	NB	WB
(g/mL) ۰/۰۵PPE	NB	MB	NB	WB

PPE: عصاره پوست انار، NB: عدم تشکیل بیوفیلم، WB: قدرت تشکیل بیوفیلم ضعیف، MB: قدرت تشکیل بیوفیلم متوسط و SB: قدرت تشکیل بیوفیلم قوی

در زمان ۱۲ ساعت مشاهده شده است که غلظت های g/mL ۰/۰۰۱ و ۰/۰۰۵ قادر به ممانعت از تشکیل بیوفیلم نبوده و مقدار بیوفیلم حاصله بسیار زیاد بوده است. همچنین میزان بیوفیلم تشکیل شده در غلظت های g/mL۰/۰۱ و ۰/۰۵ متوسط بوده است. پس می توان این گونه استنباط نمود که در این زمان و در این غلظت ها عصاره پوست انار در حال تاثیر گذاشتن بوده است.

همچنین در زمان ۱۸ ساعت مشاهده شده است که تنها غلظت g/mL ۰/۰۰۱ قادر به ممانعت از تشکیل بیوفیلم نبوده ولی بقیه تیمارها در کنترل مقدار بیوفیلم حاصله موفق عمل کرده اند و قدرت تشکیل بیوفیلم توسط باکتری ضعیف بوده است.

همچنین در زمان ۲۴ ساعت مشاهده شد که نوع بیوفیلم تشکیل شده درتیمار g/mL ۰/۰۰۱ از نوع قوی بوده است. در یک غلظت بالاتر، یعنی در g/mL۰/۰۰۵ میزان بیوفیلم حاصله کمی کاهش داشته و از نوع متوسط بوده است و در غلظت های g/mL ۰/۰۱ و ۰/۰۵ بیوفیلم تشکیل شده ضعیف بوده است.

آنالیزهای آماری تأثیر عصاره پوست انار برروی تشکیل بیوفیلم : در مورد تیمارهای عصاره پوست انار نیز مشاهده می شود که غلظت های g/mL ۰/۰۱ و ۰/۰۵ در یک گروه قرار داشته و نسبت به همدیگر تفاوت معنی داری ندارند، در حالیکه دو غلظت دیگر یعنی g/mL ۰/۰۰۱ و ۰/۰۰۵ هر یک در گروه های مجزا قرار می گیرند که هم نسبت به یکدیگر و هم نسبت به گروه g/mL ۰/۰۱ و ۰/۰۵ در سطح $P > ۰/۰۵$ تفاوت معنی داری دارند (جدول ۲).

جدول۲: آنالیز آماری تشکیل بیوفیلم در تیمارهای متفاوت عصاره پوست انار

غلظت عصاره پوست انار (g/mL)	زیرگروه ۱	۲	۳
۰/۰۵۰	۰/۰۹۷۵		
۰/۰۱۰	۰/۰۹۷۸		
۰/۰۰۵		۰/۱۲۰۱	
۰/۰۰۱			۰/۱۴۳۷
Sig	۰/۶۸۱	۱/۰۰۰	۱/۰۰۰

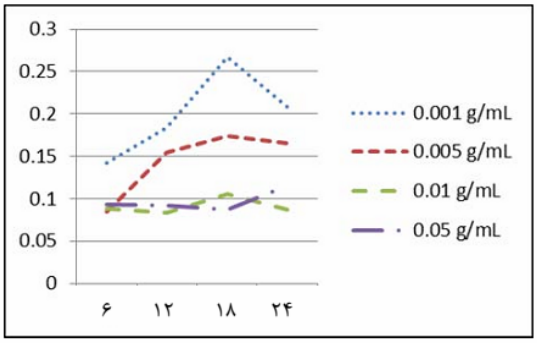
(گروه های هم شماره اختلاف آماری معنی داری ندارد)

آنالیزهای تأثیر عصاره پوست انار بر میزان درصد کاهش بیوفیلم: نکته قابل مشاهده در نتایج این است که به ترتیب در زمان های ۶ و ۱۸ ساعت و سپس۱۲ و ۲۴ ساعت کاهش درصد تشکیل بیوفیلم بیشترین مقادیر را به خود اختصاص داده است (جدول ۳).

جدول۳: نتایج آنالیز میزان درصد کاهش بیوفیلم در تیمارهای متفاوت عصاره پوست انار (PPE)

	۶ ساعت	۱۲ ساعت	۱۸ ساعت	۲۴ ساعت
(g/mL)۰/۰۰۱PPE	۶۱/۰۴	۸۹/۰۶	۶۵/۶۹	۷۹/۶۰
(g/mL) ۰/۰۰۵PPE	۶۵/۵۸	۷۰/۸۲	۲۴۴/۵۳	۵۸/۷۱
(g/mL) ۰/۰۱PPE	۷۲/۰۸	۲۸/۲۷	۲۳۵/۰۴	۱۹/۱۵
(g/mL) ۰/۰۵PPE	۱۵۴/۵۵	۳۳/۴۳	۲۲۱/۱۷	۳۳/۳۳

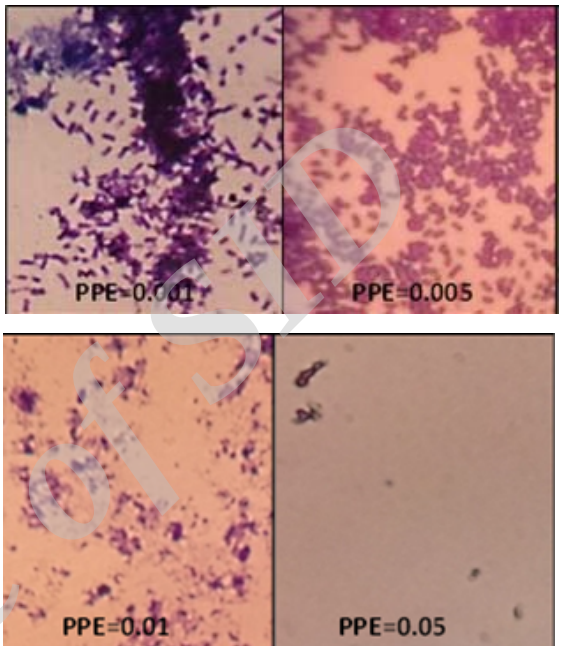
بررسی کینتیک تشکیل بیوفیلم: نتایج حاصله از تیمار عصاره پوست انار (شکل ۱) نه تنها نشاندهنده تفاوت هائی در روند تشکیل بیوفیلم در زمان های ۶، ۱۲، ۱۸ و ۲۴ ساعت بوده، بلکه در غلظت های متفاوت نیز تفاوتهای عمده ای مشاهده می شود.به این ترتیب که غلظتهای g/mL ۰/۰۱ و ۰/۰۵ به خوبی باعث کاهش تشکیل بیوفیلم از ابتدای اعمال تیمار بوده اند. همان گونه که ازشکل مربوطه پیداست افزایشی در میزان بیوفیلم تا زمان حدود ۱۸ ساعت رخ داده است و پس از آن کاهش در میزان بیوفیلم به دلیل تاثیر تیمارها رخ داده است. این نتایج بیان گر تاثیر مثبت اعمال تیمارهای متفاوت می باشد.



شکل ۱: کینتیک رشدی وابسته به زمان (۶، ۱۲، ۱۸ و ۲۴ ساعت) باکتری در تیمارهای متفاوت عصاره پوست انار

Archive of SID
www.SID.ir

مشاهده بیوفیلم تشکیل شده با میکروسکوپ: نتایج میکروسکوپی تیمار با عصاره پوست انار در غلظت های متفاوت نشانگر تاثیر ضد میکروبی در غلظت های ۰/۰۱ و ۰/۰۵ g/mL می باشد. این امر با کاهش فاحش تعداد باکتری های رنگ آمیزی شده به همراه تغییر شکل باکتری (به سمت کروی شدن) قابل مشاهده می باشد (شکل ۲).



شکل ۲: شمایی ار تصاویر میکروسکوپی تاثیر عصاره پوست انار (PPE) در غلظت های متفاوت بر روی رشد باکتری و تشکیل لایه بیوفیلم بر روی اسلاید

بحث:

برمبنای یافته های حاصل از آزمایش و استفاده از فرمول های ارائه شده اینگونه می توان جمع بندی نمود که بیشترین تاثیر تیمارهای عصاره پوست انار در ۱۸ ساعت بوده است که معادل مرحله رشد لگاریتمی باکتری می باشد که در آن باکتری ها بیشترین حساسیت را نسبت به مواد و بازدارنده های رشد دارند. همچنین از سوی دیگر این امر را می توان به مقدار مواد مؤثر پس از گذشت زمان و پایداری ترکیبات نسبت دارد. روند مشاهده شده ی میزان متفاوت تولید بیوفیلم با گذشت زمان می تواند بیانگر اثرگذاری متفاوت تیمارها در زمان های رشد با توجه به فاز رشدی و متعاقباً بیان ژن های متفاوت درگیر و قدرت تحمل باکتری ها داشته باشد.

پریرا و همکاران نشان دادند که عمل ضد میکروبی انار بر روی بیوفیلم باکتری های بیوفیلم دندان مرتبط با اختلال در سنتز پلی گلیکان می باشد که در بر روی اتصال باکتری ها تاثیر گذاشته از آن ممانعت می کند (۱۶). در مطالعه واسکوئنسلوس و همکاران قدرت مهاری ژل حاوی عصاره بر روی تشکیل بیوفیلم کاندیدا آلبیکنس و استرین های باکتری استرپتوکوک مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که عمل ضد میکروبی این ژلها وابسته به اختلال در سنتز گلوکان می باشد (۳).

در مطالعات عدیده ای ثابت شده است که بیشترین مقدار ترکیبات فنلی در پوست انار یافت می شود. بنابراین، دور از ذهن نخواهد بود که این بخش از انار در مقایسه با بخش های دیگر دارای تاثیر ضد میکروبی بیشتری باشد. چنانچه در مطالعه انجام شده به روش چاهک گذاری روی آگار مشخص شد که از بین عصاره پوست، هسته و آب انار بالاترین‌میزان‌فعالیت ضدباکتریائی‌در عصاره متانولی پوست انار می باشد و در این بین بالاترین تأثیر ضدباکتریائی به ترتیب بر روی باکتری های B.cereus، S. aureus و K. Pneumoniae بود (۱۷). در مطالعه باکیارا و همکاران مشخص گردید که میزان MIC عصاره متانولی پوست انار بر روی باکتری های S. aureus و E. coli در حد ۲۵۰ میلی گرم در میلی لیتر بود. در حالی که میزان غلظت ضد بیوفیلمی عصاره متانولی بر روی باکتری های S. aureus، E. coli و قارچ C. albicans به ترتیب ۱۲۵، ۱۵۰ و ۲۵۰ میلی گرم در میلی لیتر بود. همچنین آنان با انجام آزمایشات HPLC نشان دادند که ترکیب عمده عصاره پوست انار به نام الاجی تانین (مشتمل بر پونیکالاجین و الاجیک اسید) مسئول اصلی اثرات ضدبیوفیلمی این عصاره می باشد (۱۸). همان گونه که قبلا اشاره شد در بررسی اثر غلظت های متفاوت پوست انار به صورت جداگانه مشخص گردید که غلظت ۰/۰۱ g/mL دارای بیشترین تاثیر می باشد. نتایج مطالعه حاضر ثابت نمود که غلظت موثره عصاره انار ۰/۰۱ g/mL می باشد که نسبت به تحقیقات باکیارا و همکاران ده برابر کمتر است که این امر می تواند به دلیل محتوای بالاتر ترکیبات پلی فنلی در عصاره متانولی مورد استفاده در این طرح باشد که از انارهای پوست سیاه حاصل شده است. با توجه به نتایج حاصله می توان اینگونه اذعان داشت که انارهای پوست سیاه دارای ماده موثره بیشتری می باشند.

Archive of SID

www.SID.ir

در تمامی تیمارهای عصاره پوست انار مشاهده شد که در شش ساعت اول بیوفیلمی تشکیل نشده است. در این مرحله چون باکتری در حال سازگار شدن با محیط و شروع تقسیمات بوده وارد فاز تشکیل بیوفیلم نشده است و در عین حال تعداد آنها بسیار کم می باشد. همچنین این موضوع می تواند به دلیل نحوه بیان ژن های درگیر در تشکیل بیوفیلم و مدت زمان لازم برای ته نشست باکتری و تولید مواد اگزوپلی ساکاریدی و پروتئینی لازم برای ایجاد ماتریکس اولیه جهت بستر سازی برای بیوفیلم باشد (۱۹).

نتایج میکروسکوپی این مطالعه مطابق با تحقیقات انجام شده توسط باکیارا و همکاران می باشد (۱۸). به این صورت که نتایج بررسی میکروسکوپ کانفوکال آن ها نشان داد که ساختار و ضخامت باکتری های تحت تاثیر عصاره متانولی پوست انار کاهش می یابد که در نهایت با کاهش میزان بیوفیلم بر روی اسلاید همراه بوده است.

نتیجه نهایی:

از نتایج مطالعه حاضر می توان پی برد که کارایی غلظت های مختلف عصاره پوست انار در برداشتن بیوفیلم از سطوح و کشتن باکتری های درون بیوفیلم متفاوت می باشد، چنانچه برخی از غلظت ها بسیار موثر بودند. البته حذف کامل بیوفیلم تنها با این تیمارها به دست نمی آید، حتی اگر آن عامل مورد استفاده در مقابل سلول های پلانکتونیک بسیار مؤثر باشد. بنابراین، برای حذف کامل بیوفیلم بر روی سطوح دستگاه ها، تجهیزات پزشکی، محیط کارخانه های تولیدی و اماکن بهداشتی بهتر است از ترکیب چندین ضد عفونی کننده و ترکیبات موثره عصاره پوست انار به طور همزمان استفاده گردد. از آنجایی که تشکیل بیوفیلم در سیستم ها بیانگر وجود آلودگی در محیط می باشد (که بعضاً غیر قابل اجتناب نیز می باشد)، به نظر می رسد جلوگیری از تشکیل بیوفیلم با مطالعه بیشتر اثر ترکیبات خاص موجود در عصاره پوست انار بر بیوفیلم باکتری ها دست یافتنی باشد. با توجه به اثرات ضد میکروبی قابل توجه عصاره پوست انار که می توان به راحتی آن ها را تهیه نمود، پیشنهاد می گردد.

همچنین با توجه به نتایج حاصله‌از این مطالعه اینگونه استنباط می گردد که کینتیک تشکیل بیوفیلم باکتری سودوموناس آئروجینوزا تا ۱۸ ساعت نسبت به ترکیبات ضدمیکروبی مورد استفاده حساس بوده است. بنابراین، پیشنهاد می‌گردد در اعمال تدابیر و تیمارهای ضدمیکروبی این مدت زمان را جهت ضدعفونی نمودن و دوره های آن مدنظر قرار داد تا این فرایند مثمر ثمر تر واقع شود.

میوه انار از جمله غنی ترین منابع فلاونوئیدها و اسیدهای فنولی هستند که جز مواد موثره و درمانی گیاهان محسوب می شود. انتخاب عصاره پوست انار به عنوان ترکیبی که بیوفیلم ها کمترین مقاومت را به آن نشان می دهند و بیشترین درصد از آنها را حذف کرده و از بین می برد، هم هزینه ها را کاهش می دهد و هم محیط هایی را که در آنها شستشوی مؤثر انجام شده است، حفظ می کند. از سوی دیگر به دلیل طبیعی بود این محلول و عدم تأثیر منفی بر انسان و اطمینان مصرف کنندگان استفاده از آن به راحتی قابل توصیه می باشد. با توجه به نتایج بدست آمده در این مطالعه می توان به بررسی دقیق تر تاثیر ترکیبات عمده موجود در عصاره انار پرداخت و با جداسازی آن ترکیب، آن را در ساخت محصولاتی از قبیل دهان شویه ها و... استفاده نمود.

سپاسگزاری:

این مقاله منتج از طرح تحقیقاتی میباشد که کلیه اعتبارات آن، توسط معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد همدان تامین شده است. بنابراین، لازم می دانیم از حمایت های حوزه معاونت یاد شده کمال تشکر و قدردانی را به جا آوریم. همچنین از زحمات بی شائبه جناب آقای دکتر فرمانی و دکتر سیف که در آنالیز نتایج ما را یاری کردند، صمیمانه سپاسگزاریم.

References

1. O' Tool GA, Kapla H B, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. Annu Rev Microbiol 2000; 54: 49-79.
2. Saderi H, Owlia P, Hashemi S. The effect of essential oil of Matricaria chamomilla L. on biofilm formation of Pseudomonas aeruginosa. Iran J Med Microbiol 2007; 1 (2): 9-14.
3. Vasconcelos LC, Sampaio FC, Sampaio MC, Pereira Mdo S, Higino JS, Peixoto MH. Minimum inhibitory concentration of adherence of Punica granatum Linn (pomegranate) Gel against S. mutans, S. mitis and C. albicans. Braz Dent J 2006; 17 (3): 223-7.
4. Kjelleberg S, Givskov M. The biofilm mode of life–mechanisms and adaptations. Norfolk: Horizon Bioscience, 2007: 5–15.
5. Yousefi Mashouf R, Sadeghiyan S, Pathogenesis

Archive of SID
www.SID.ir

bacteria in medicine. Hamadan: Hamadan University of Medical Scinces, 2005:108-116.
6. McEachran DP, O'Toole GA. Do not fear commitment: the initial transition to a surface lifestyle by Pseudomonads. In:Kjelleberg S, Givskov M, (eds).The biofilm mode of life–mechanisms and adaptations. Norfolk: Horizon Bioscience, 2007; 23–35.
7. Yunfeng Li, Changjiang Guo , Jijun Yang, Jingyu Wei, Jing Xu, Shuang Cheng. Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. Food Chem 2006; 96: 254- 260.
8. Endo EH, Ueda-Nakamura T, Nakamura CV, Filho BP. Activity of spray-dried microparticles containing pomegranate peel extract against candida albicans. Molecules 2012; 17 :10094-10107.
9. Al-Zoreky NS. Antimicrobial activity of pomegranate (Punica granatum L.) fruit peels. Int J Food Microbiol 2009; 134: 244-248.
10. O'Toole GA, Gibbs KA, Hager P W, Phibbs P V, Kolter R. The global carbon metabolism regulator Crc is a component of a signal transduction pathway required for biofilm development by pseudomonas aeruginosa. J Bacteriol 2000; 182: 425-431.
11. Agarwal R, Singh S, Bhileganonkar KN, Singh VP. Optimization of microtitre plate assay for the testing of biofilm formation ability in different Salmonella serotypes. Int Food Res J 2011; 18 (4): 1493-1498.
12. Maldonado NC, Silva de Ruiz C, Cecilia M, Nader-Macias M E. A simple technique to detect klebsiella biofilm forming-strains. Inhibitory potential of Lactobacillus fermentum CRL 1058 whole cells and products.) In: Méndez-Vilas A, ed. Communicating current research and educational topics and trends in applied microbiology. Formatex 2007: 52-59.
13. Tahmourespour A. Salehi R. Kermanshahi-Rooha K. Lactobacillus acidophilus-derived biosurfactant effect on gtf B and gtf C expression level in Streptococcus mutans biofilm cells. Braz J Microbiol 2011 42 (1): 330-339.
14. Nyenje ME, Gree E, Ndip RN. Biofilm Formation and adherence characteristics of Listeria ivanovii strains isolated from ready-to-eat foods in Alice, South Africa. Sci World J 2012 doi: 10.1100/2012/873909.
15. Namasivayam SKR, Preethi M, Bharani RSA. Biofilm inhibitory effect of Silver nanoparticles coated catheter against Staphylococcus aureus and evaluation of its synergistics effect with antibiotics. Int J Biol Pharmaceutical Res 2012; 3 (2): 259-265.
16. Pereira JV, Pereira MSV, Higino JS, Sampaio FC, Alves PM, Araújo CRF. Estudos com o extrato da Punica granatum Linn. (Romã): efeito antimicrobiano in vitro e avaliação clínica de um dentifrício sobre microorganismos do biofilme dental. Rev Odonto Ciênc 2005; 20(49): 262-269. (Italian)
17. Dahham SS, Ali MN, Tabassum MKh. Studies on antibacterial and antifungal activity of pomegranate (Punica granatum L.). Am Eur J Agric Environ Sci 2010; 9 (3): 273-281.
18. Bakkiyara JD, Nandhini JR, Malathy B, Pandian SK. The anti-biofilm potential of pomegranate (Punica granatum L.) extract against human bacterial and fungal pathogens. Biofouling 2013; 29(8):929-37.
19. O' TooleG A, Kolter R. Initiation of biofilm formation in Pseudomonas fluorescens WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways. A genetic analysis. Molecular Microbiol 1998; 28: 449-461.

Archive of SID

www.SID.ir

Original Article

Study on Hydro-Alcoholic Extract Effect of Pomegranate Peel on Pseudomonas aeruginosa Biofilm Formation

R. Habibipour, Ph.D.*; L. Moradi Haghgou, M.Sc.**

Received: 19.4.2015 Accepted: 15.8.2015

Abstract

Introduction & Objective: Microorganisms form biomass as biofilm in response to many factors, in order to adapt to hostile extracellular environments and biocides. Using different herbal compounds are of those strategies to deal with biofilm. It has been proved that plants extracts such as pomegranate, raspberry and chamomile essential oils have anti-biofilm effects. This study aimed to evaluate the effect of different concentrations of black peel pomegranate extract on Pseudomonas aeruginosa biofilm formation.

Materials & Methods: In this experimental research the anti-biofilm effect, reducing the amount of biofilm formation and growth kinetics of Pseudomonas aeruginosa in different treatments was measured by microtiter and plate colorimetric crystal violet method. Biofilm formation was also examined using a microscope. Statistical analysis of data obtained from the reading of the ELISA was performed using SPSS software, P value 0.05.

Results: Findings of this study showed that bacteria cannot form any biofilm in first 6 hours of incubation, in all treatments. The amount of biofilm formation after 12 hours in 0.01 and 0.05 g/ mL treatments were medium. Among treatments, after 18 and 24 hours of incubation 0.001 g/ mL concentration of pomegranate peel extract had medium and strong inhibitory effect on biofilm formation, respectively.

Conclusion: Results of this study showed that biofilm formation and biofilm reduction percentage is directly related to the duration of exposure of bacteria that could be due to the different phases of growth. Growth kinetics study also revealed that in the majority of treatments the growth was incremental up to about 15 hours and decrement afterwards due to the effectiveness of different treatments. After 18 hours, treatments have greatest influence on biofilm formation. The foregoing has been fully confirmed by the results of microscopic slides.

(Sci J Hamadan Univ Med Sci 2015; 22 (3): 195-202)

Keywords: Biofilms / Kinetics / Pomegranate / Pseudomonas aeruginosa

Archive of SID

* Assistant Professor, Department of Microbiology, School of Basic Sciences
Islamic Azad University, Hamadan Branch, Hamadan, Iran. (habibipour@iauh.ac.ir)
** M.Sc. in Biotechnology, School of Basci Sciences, Islamic Azad University, Hamadan Branch, Hamadan, Iran.

www.SID.ir