



Investigating the antibacterial and anti-bioilm effects of pomegranate seed extract on treatment-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from Laleh hospital in Tehran

Melika Falahati¹, Mina Ramezani^{2*}, Behin Omid³

¹MSc., Department of Biology, CT.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran

²Associated professor, Department of Biology, CT.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran

³Assistant Professor, Department of Biology, CT.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran

Place of Research: Laboratory of CT.C., Islamic Azad University

Article Info

Abstract

Article History:

Recived 2025.05.04

Revised 2025.05.16

Accepted 2025.05.20

KeyWords:

Pomegranate
Antimicrobial properties
Acinetobacter baumannii
Antibiotic resistance
Chromatography

*Corresponding author:

E-mail address:

Mina.ramezani@gmail.com,
m.ramezani@iaui.ac.ir

Introduction: In recent decades, the escalating antibiotic resistance among pathogenic bacteria has heightened the necessity for discovering and developing new and effective antimicrobial agents. One of the natural sources that has garnered attention due to its diverse bioactive compounds is the pomegranate (*Punica granatum* L.). This study aims to investigate the antimicrobial properties of pomegranate seed extract and evaluating its ability to reduce the expression of genes related to the biofilm formation of *Acinetobacter baumannii*.

Materials and Methods: In this study, pomegranate seed extract was first extracted by mixing method and then analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) methods. *Acinetobacter baumannii* samples were collected from the trachea, lungs and urine of patients admitted to Laleh Hospital's ICU and were identified by standard tests after culture in the MacConkey agar environment. Then the antibiogram and MIC test were performed in the cultivated group with and without proximity to the extract. The expression of *BAP*, *ABAI* genes was investigated by real time-PCR in three groups; control, extract and chlorhexidine group. The results were analyzed by one-way ANOVA and Tukey's test.

Results: The results showed that pomegranate seed extract contains a wide range of chemical compounds including propanediol, furan carboxyaldehyde, hexadecanoic acid, octadecanoic acid and Chlorzoxazone, which have strong antimicrobial potential. The data showed that pomegranate seed extract has the ability to inhibit the growth and proliferation of *Acinetobacter baumannii* bacteria. It also reduces the expression of biofilm formation genes *BAP*, *ABAI* which has the same effect as the disinfectant chlorhexidine.

Conclusion: The findings of this study indicate that pomegranate extract could serve as an effective natural source for the development of new antimicrobial drugs and antibiotic alternatives.

Cite this article: M Falahati, M Ramezani, B Omid, nvestigating the antibacterial and anti-bioilm effects of pomegranate seed extract on treatment-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from Laleh hospital in Tehran. Iranian Journal of Biological Sciences. 2024; 19 (3): 27-37

doi 10.71631/zisti.2024.1205824

Publisher: Islamic Azad University of Varamin – Pishva branch

Print ISSN: 1735-4226

Online ISSN: 1727-459X

This is an open access article under the: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>



بررسی اثر ضد باکتریایی و ضد بیوفیلمی عصاره هسته انار بر اسینتوباکتر بومانی مقاوم به درمان جداسازی شده از بیمارستان لاله تهران

ملیکا فلاحتی^۱، مینا رمضانی^۲، بهین امیدی^۳

^۱ کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

^۲ دانشیار، گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

^۳ استادیار، گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

محل انجام تحقیق: دانشگاه آزاد واحد تهران مرکزی

چکیده

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

ارسال ۱۴۰۴/۰۲/۱۴

بازنگری ۱۴۰۴/۰۲/۲۶

پذیرش ۱۴۰۴/۰۲/۳۰

مقدمه: در دهه‌های اخیر، افزایش روزافزون مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین باکتری‌های پاتوژن، نیاز به کشف و توسعه عوامل ضد میکروبی جدید و مؤثر را بیش از پیش ضروری کرده است. یکی از منابع طبیعی که به دلیل ترکیبات فعال زیستی متنوعش مورد توجه قرار گرفته، گیاه انار (*L.Punica granatum*) است. این پژوهش با هدف بررسی خواص ضد میکروبی عصاره هسته انار و ارزیابی توانایی آن در کاهش بیان ژنهای مربوط به تشکیل بیوفیلم باکتری اسینتوباکتر بومانی انجام شده است.

مواد و روش: در این مطالعه، ابتدا عصاره هسته انار با روش میکسینگ استخراج شد و سپس با روش‌های کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنجی جرمی (GC-MS) تجزیه و تحلیل شد. نمونه اسینتوباکتر بومانی از تراشه، ریه و ادرار از بیماران بستری در ICU بیمارستان لاله جمع‌آوری شد و پس از کشت در محیط مک کانگی آگار توسط تست‌های استاندارد شناسایی شد. سپس تست آنتی‌بیوگرام و MIC در هفت ایزوله اسینتوباکتر بومانی (۵ سویه معمولی و ۲ سویه مقاوم XDR) کشت شده با و بدون مجاورت با عصاره انجام شد. بیان ژن‌های تشکیل بیوفیلم BAP, ABAI توسط Real time-PCR در سه گروه کنترل بدون عصاره، گروه عصاره و گروه کلروهگزیدین بررسی شد. نتایج توسط آنووا یک طرفه و تست توکی تجزیه و تحلیل‌ها شد.

نتایج: نتایج نشان داد که عصاره هسته انار حاوی مجموعه‌ای گسترده از ترکیبات شیمیایی از جمله پروپاندیول، فوران کربوکسی آلدهید، هگزادکانوئید اسید، اکتادکانوئید اسید و کلروزوکسازون است که دارای پتانسیل‌های ضد میکروبی قوی می‌باشند. عصاره هسته انار توانایی مهار رشد و تکثیر باکتری اسینتوباکتر بومانی را دار بوده، همچنین باعث کاهش معنادار بیان ژن‌های BAP, ABAI می‌شود ($p < 0.05$) که اثر آن مشابه ماده ضد عفونی کننده کلروهگزیدین است.

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که عصاره انار می‌تواند به عنوان یک منبع طبیعی مؤثر برای توسعه داروهای ضد میکروبی جدید و جایگزین‌های آنتی‌بیوتیکی در نظر گرفته شود.

کلمات کلیدی

انار

خواص ضد میکروبی

اسینتو باکتر بومانی

مقاومت آنتی‌بیوتیکی

بیوفیلم

* مسئول مکاتبات:

mina.ramezani@gmail.com

m.ramezani@iaub.ac.ir

شیوه آدرس‌دهی این مقاله: م فلاحتی، م رمضانی، ب امیدی. بررسی اثر ضد باکتریایی و ضد بیوفیلمی عصاره هسته انار بر اسینتوباکتر بومانی مقاوم به درمان جداسازی شده از بیمارستان لاله تهران مجله دانش زیستی ایران. ۱۹:۱۴۰۳ (۳): ۲۷-۳۷

doi: 10.71631/zisti.2024.1205824

نویسندگان: حق مؤلف ©

شاپا الکترونیکی: ۴۵۹ X - ۲۷۱۷

شاپا چاپی: ۱۷۳۵-۴۲۲۶

ناشر: دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین - پیشوا

مقدمه

اسینتوباکترها به عنوان باکتریهای گرم منفی، میتوانند در شرایط نامساعد، سطوح خشک و همچنین محیط آبی به مدت طولانی زنده بمانند. با وجود اینکه از ویرولانس پایینی برخوردارند، اما موجب طیف وسیعی از عفونتها میشوند (۱). مهمترین گونه این جنس، اسینتوباکتر بومانی میباشد که میتواند عفونتهای بیمارستانی مجاری ادراری، عفونت های زخم، عفونت خون، ذات الریه به عنوان یک عفونت ریوی و حتی سپتی سمی ایجاد نماید. عفونتهای محل جراحی، مننژیت، عفونت سیستم عصبی مرکزی، بافت نرم و استخوان نیز در یک دهه ی اخیر گزارش شده است (۲). این باکتری به دلیل توانایی بالای خود در توسعه مقاومت به چندین نوع آنتی بیوتیک، مشکلات زیادی را در درمان عفونتها ایجاد کرده است که روشهای معمول درمانی به دلیل این مقاومت بالا اغلب ناکارآمد بوده و بیماران را در معرض خطرات جدی تری قرار می دهند (۳ و ۴). از سوی دیگر، تشکیل بیوفیلم توسط این باکتری ها بر روی سطوح مختلف تجهیزات پزشکی و بافت های بدن انسان، توانایی آنها را در مقاومت به درمان های ضد میکروبی افزایش می دهد (۵). این مسئله نیاز به یافتن راهکارهای نوین و مؤثر برای مقابله با این عفونتها را بیش از پیش برجسته می کند. یکی از روشهای درمانی نوین استفاده از اثرات ضد میکروبی و ضد بیوفیلمی عصاره های گیاهی می باشد (۶). از جمله این ترکیبات می توان به عصاره میوه انار اشاره کرد که تحقیقات زیادی روی آن انجام شده است. انار دارای ترکیبات مهمی از جمله پونیکالازین و اسید الاژیک است که به دلیل خواص ضدباکتریایی و ضدقارچی خود، نقش مهمی در مهار رشد باکتریها ایفا می کنند. پونیکالازین با تخریب دیواره سلولی باکتری ها و مهار آنزیم های حیاتی، توانایی بالایی در مهار رشد میکروارگانیسم های بیماری زا دارد. این ماده همچنین آنزیم های مهم باکتریایی مانند DNA ژیراز و توپوایزومراز را که برای تکثیر و تقسیم DNA حیاتی هستند، مهار می کند (۷ و ۸). علاوه بر این اسید الاژیک به عنوان یک ترکیب فنولی با خاصیت آنتی اکسیدانی است که می تواند با مهار تولید رادیکال های آزاد و اختلال در فرآیندهای سلولی باکتری ها، به کنترل عفونت ها کمک کند (۹). همچنین، تنوع دیگر ترکیبات شیمیایی موجود در عصاره، شامل فلاونوئیدها و تانن ها، نشان دهنده

پتانسیل بالای این گیاه در ارائه اثرات چندجانبه علیه باکتری ها و بیوفیل ها است (۱۰). پروتئین های مختلفی در ایجاد مقاومت بیوفیلمی تاثیرگذارند که از این بین میتوان به پروتئین های ایجاد کننده و تقویت کننده ساختار بیوفیلیم اشاره کرد. اولین عضو این گروه از پروتئینها به عنوان BAP در باکتری اسینتوباکتر بومانی شناسایی شده است. این پروتئین در سطح خارجی باکتری ها قرار دارند؛ شامل هسته مرکزی متشکل از تکرارهای متوالی از توالیهای مشابه هستند که به باکتری قابلیت تشکیل بیوفیلیم میدهد، به این ترتیب نقش مهمی در عفونت زایی پاتوژنها دارند (۱۱). اسینتوباکتر بومانی با بیان ژن BAP سبب کاهش نفوذپذیری و در نتیجه ایجاد مقاومت به کاربامپنها میشود و علاوه بر آن با چسبندگی بالایی که با سطح زنده و غیرزنده ایجاد میکند موجب پایداری بالای عامل بیماری زا میشود. در تحقیقی نشان داده شد که عصاره انار و یکی از اجزای اصلی آن اسید الاژیک باعث کاهش تشکیل بیوفیلیم شده و بیوفیلیم از پیش ساخته شده *C. albicans* را در یک مطالعه بیوفیلیم آزمایشگاهی ریشه کن می کند (۱۲).

در سال ۲۰۱۰، فعالیت ضد باکتریایی عصاره خام و خالص شده پوست انار در پژوهشی مورد بررسی قرار گرفت. دیسک های بارگذاری شده با غلظت ۸ میلی گرم، به ترتیب ۲۰ و ۳۰ میلی متر منطقه بازداری را در برابر جدایه های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیا کولای نشان دادند. عصاره استاندارد پوست انار فعالیت مهاری کمتری را نسبت به ترکیب با آنتی بیوتیک تتراسایکلین نشان داد (۱۳). عصاره متانولی پوست انار تشکیل بیوفیلیم را مهار کرد و بیوفیلیم از پیش ساخته شده استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیا اکولای را در محدوده غلظت ۲۵ تا ۱۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر از بین برد (۱۲). در مطالعه ای، اسید الاژیک مهار بیوفیلیم را در غلظت های تا حدودی کمتر (۵ تا ۴۰ میکروگرم در میلی لیتر) نسبت به عصاره پوست انار نشان داد (۱۴). تحقیقات انجام شده توسط کریمی و همکاران نشان داد که عصاره انار دارای اثرات ضد میکروبی و ضد بیوفیلیم بر روی سوبه های بالینی باکتری اسینتوباکتر بومانی است. این تحقیق از روش میکرودیولوشن در محیط کشت برای تعیین غلظت مهارکننده حداقلی (MIC) و غلظت کشنده

حداقلی (MBC) استفاده کرد، در حالی که تخریب بیوفیلیم از طریق آزمون رنگی MTT انجام شد. یافته‌ها نشان دادند که عصاره توانایی مقابله با سویه‌های چند دارویی باکتری اسینتوباکتر بومانی را دارد (۱۵) مطالعه حاضر امکان ارزیابی کارایی عصاره هسته انار

مواد و روش‌ها

جمع آوری و شناسایی نمونه اسینتوباکتر بومانی

در مرحله اول مطالعه، ابتدا نمونه‌های اسینتوباکتر از بیماران بستری در بخش ICU بیمارستان لاله تهران با دقت جمع‌آوری شدند و با روش‌های استاندارد ایزوله شدند. نمونه‌ها از افراد بالای ۴۴ سال و مبتلا به عفونت ادراری، عفونت کلیه و مجاری ادراری و عفونت حاد ریه جدا شد. کشت باکتری روی محیط مک کانگی آگار و بلاد آگار برای تشخیص اولیه انجام شد. سپس کشت روی محیط‌های افتراقی (لوله ای) جهت تشخیص بالینی انجام شد. کشت روی محیط مولر هیتون آگار ساده (۳ پلیت) و بدنال آن تست‌های آنتی بیوگرام صورت گرفت و هاله تشکیل شده و یا عدم رشد هاله که نشان دهنده عدم رشد باکتری است ثبت شد و لام رنگ آمیزی گرم نیز مشاهده گردید.

تهیه عصاره هسته انار

پس از جمع آوری، خشک کردن و آسیاب کردن هسته انار، عصاره آن به روش میکسینگ تهیه شد (۱۶). به این صورت که مقدار ۵۰ گرم از پودر هسته‌ها را داخل بشر ریخته و مقدار ۲۰۰ سی سی حلال (الکل آب) را داخل بشر ریخته و با استفاده از نایلن درب بشر را پوشاندیم. سپس استیرر را روشن نموده و حرارت در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد تنظیم شد. در پایان با استفاده از پمپ خلا و قیف بوختر محلول نهایی صاف شده و محلول نهایی به بالن ۲۵۰ سی سی منتقل شد. به منظور تغلیظ عصاره از سیستم تقطیر استفاده شد. آنچه در بالن باقی می ماند عصاره است. سپس عصاره حاصله با روش‌های کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنجی جرمی (GC-MS) تجزیه و تحلیل شد

بررسی تاثیر عصاره هسته انار بر اسینتوباکتر بومانی با روش دیسک دیفیوژن

مقاومت آنتی بیوتیکی نمونه‌ها با استفاده از روش آنتی

به عنوان یک راه‌حل جایگزین یا مکمل در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های متداول در برابر این باکتری را فراهم می‌آورد و می‌تواند به توسعه راهکارهای جدیدی برای کنترل عفونت‌های بیمارستانی کمک کند

بیوگرام یا دیسک دیفیوژن انجام شد (۱۷). به منظور تهیه سوسپانسیون باکتری جهت انجام آزمایشات، ابتدا سلول‌های باکتریایی از سطح محیط کشت به کمک لوپ استریل جمع‌آوری و در یک میلی لیتر بافر سالین فسفات (PBS: Phosphate-Buffered-Salin) استریل با کدورت نیم مک فارلند $10^8 \times 1-1/5$ عدد باکتری در هر میلی لیتر (CFU/ml) تهیه شد و روی محیط کشت مولر هیتون آگار و به وسیله سوآپ به صورت چمنی کشت داده شدند (۱۸).

دیسک‌های بلانک با ۱۰ میکرولیتر از عصاره هسته انار آغشته شد، دیسک آنتی بیوتیک (به عنوان کنترل مثبت) و یک دیسک بلانک حاوی ۱۰ میکرولیتر آب مقطر استریل (به عنوان کنترل منفی) هم قرار داده شد. دیسک‌های آنتی بیوتیک مورد استفاده شامل، آمپی سیلین، سفازیدیم، سفپیم، سفوتاکسیم، ایمی پنم، مروپنم، جنتامایسین، توبراسیلین، آمیکاسین، تتراسایکلین، داکسی سایکلین، سیپروفلوکساسین بودند که بر اساس دستورالعمل CLSI ۲۰۲۴ انتخاب شدند. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه قرار داده شد. برای هر نمونه باکتری این آزمایش سه بار تکرار شد. پس از آن قطر هاله عدم رشد به وسیله خط کش میلی متری، اندازه گرفته شد و عدد میانگین هر سه پلیت محاسبه شد

بررسی حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) عصاره هسته انار بر اسینتوباکتر بومانی

به روش میکرودیوژن انجام شد. در این روش با استفاده از میکروتیتر پلیت ۹۶ خانه، غلظت‌های مختلف از عصاره هسته انار در مجاورت باکتری قرار می‌گیرد و رشد باکتری‌ها در برابر آن ارزیابی می‌شود. به این صورت که ابتدا در میکروپللیت ۹۶ خانه به مقدار مساوی ۱۰۰ میکرولیتر محیط مولر ریخته، به چاهک اول مقدار ۱۰۰ میکرولیتر عصاره هسته انار اضافه گردید، سپس از هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر برداشته و به چاهک بعدی اضافه

میکروپلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. بعد از این مدت رشد یا عدم رشد باکتری توسط الایزا ریدر در طول موج ۶۲۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت

شد. به این ترتیب سری رقت‌ها در هر چاهک نصف چاهک ماقبل آن است. سپس به تمامی چاهک ۵ میکرولیتر سوسپانسیون تهیه شده از هر یک از نمونه های اسینتوباکتر با رقت نیم مک فارلند را اضافه کرده، پس از بستن درب،

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده

Gene	primer	Length	PCR Product
16s	F: CTTGCACCTGATTCTAGCG	20	128
	R: CTTACGATCCCCTGCTTTCTC	21	
ABA1	F: CGCATTGTGATCCCTTCGTC	20	107
	R: ACATAGGTTCCGTGTTTCGCT	20	
BAP	F: TAGACGCAATGGATAACG	18	127
	R: TTAGAACCGATAACGATACC	20	

تجزیه و تحلیل آماری

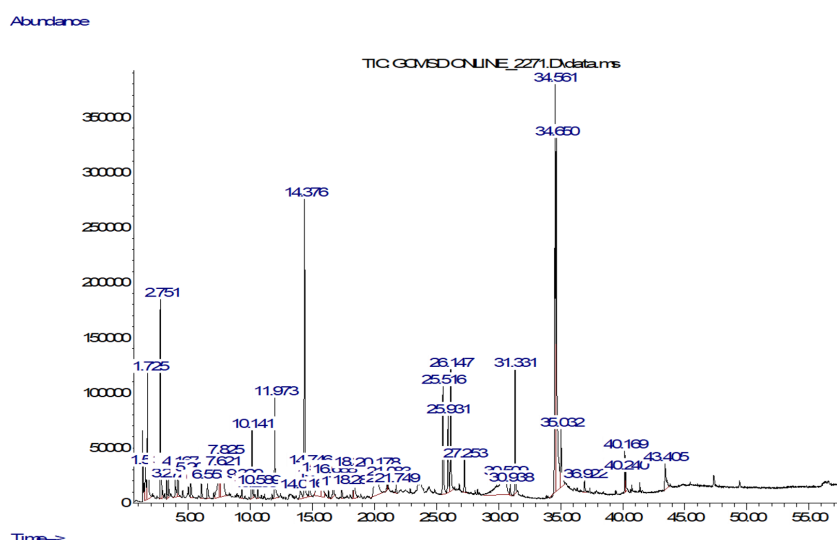
داده ها توسط نرم افزار prism به روش ANOVA یک طرفه و سپس تست توکی آنالیز شدند. سطح معنی داری $p < 0.05$ در نظر گرفته شد

هر پیک در شکل ۱ نشان دهنده یک ترکیب شیمیایی جدا شده توسط کروماتوگرافی است. نمونه شامل ترکیبات متعددی است که با زمان های بازداری مختلف جدا شده اند. پیک های عمده در زمان های بازداری ۲/۷۵۱، ۱۴/۳۷۶، ۳۱/۳۳۱ و ۳۴/۵۹۱ دقیقه مشاهده می شوند. ارتفاع

نتایج

هر پیک نشان دهنده فراوانی یا غلظت نسبی هر ترکیب در نمونه است. پیک های بلندتر نشان دهنده ترکیبات با غلظت بالاتر هستند. ترکیبات عمده موجود در نمونه در جدول ۳ آمده است

هر پیک در شکل ۱ نشان دهنده یک ترکیب شیمیایی جدا شده توسط کروماتوگرافی است. نمونه شامل ترکیبات متعددی است که با زمان های بازداری مختلف جدا شده اند. پیک های عمده در زمان های بازداری ۲/۷۵۱، ۱۴/۳۷۶، ۳۱/۳۳۱ و ۳۴/۵۹۱ دقیقه مشاهده می شوند. ارتفاع



شکل ۱. کروماتوگرام (GC-MS) هسته انار بر مبنای زمان بازداری

جدول ۲. نتایج کروماتوگرافی گازی ترکیباتی با بیشترین غلظت در عصاره هسته انار

درصد(%)	نام ترکیب	RT (min)
3.76	1,2-Propanediol	2/751
7.51	2-Furancarboxaldehyde, 5-(hydroxymethyl)-	14/376
2.67	Hexadecanoic acid (CAS) \$\$ Palmitic acid	31/331
14.19	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)- (CAS) \$\$ Linoleic acid	34/591
3.93	Chlorzoxazone	26/145

دیسک دیفیوژن و MIC

اسینتوباکتر بومانی به عنوان یکی از عوامل عفونت‌های بیمارستانی شناخته شده که مقاومت دارویی بالایی به خصوص در برابر آنتی‌بیوتیک‌های معمول نشان می‌دهد. در مجموع هفت ایزوله اسینتوباکتر بومانی (۵ سویه معمولی و ۲ سویه مقاوم XDR) از خلط، تراشه و ادرار بیماران بستری در بخش ای سی یو بیمارستان لاله بررسی شد که همگی به آنتی‌بیوتیک‌های Amikacin, Tobramycin, Gentamicin, Ampicillin/Sulbactam, Cefepime, SXT, Cefotaxime, Ceftazidime, Ceftriaxone, Ciprofloxacin, Levofloxacin, Ofloxacin, Piperacillin, Meropenem, Imipenem مقاوم بودند. اما در برابر آنتی‌بیوتیک‌های Doxycycline, Minocycline و Colistin رشد کم یا متوسط نشان دادند. در صورتیکه دو جدایه XDR فقط به آنتی‌بیوتیک Colistin تا حدی حساس بودند

MIC Acinetobacter SPP → Doxycycline $S \geq 13$,
I 10_2 , R ≤ 12, Minocycline $S \geq 13$, I 13_5.,
R ≤ 12, Colistin $S \leq 2$, R ≥ 4

جدول ۴ نتایج مقاومت آنتی‌بیوتیکی را در حضور هسته انار نشان می‌دهد، در حالی که جدول ۵ به نتایج بدون استفاده از هسته انار پرداخته است. مقایسه دو جدول نشان می‌دهد که حضور هسته انار بر کاهش مقاومت آنتی‌بیوتیکی و تغییر در سطح رشد باکتری‌ها موثر است در جدول ۴، سطح مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌هایی همچون Minocycline و Colistin به طور متوسط

بالاست. در این حالت، بسیاری از نمونه‌ها (به ویژه تراشه و خلط) مقاومت شدیدی را نشان می‌دهند. برای مثال، نمونه‌های شماره ۱ و ۵ که از تراشه گرفته شده‌اند، سطح رشد بالایی ($\geq 10,000$ cfu/ml) و مقاومت قوی در برابر Colistin دارند. همچنین، رنج حساسیت برای آنتی‌بیوتیک‌ها محدود است و در برخی نمونه‌ها مانند شماره ۵، حساسیت به Minocycline و Doxycycline در سطح متوسط (Moderate) قرار دارد

در جدول ۵ که در حضور عصاره هسته انار مورد بررسی قرار گرفته، نتایج مقاومت تغییر کرده است. تأثیر هسته انار در کاهش سطح مقاومت به ویژه در نمونه‌هایی همچون تراشه و خلط آشکار است. برای مثال، نمونه شماره ۱ از تراشه که مقاومت بالایی به Colistin داشت، در حضور عصاره تنها مقدار کمی رشد باکتری (Few) را نشان می‌دهد. همچنین، حساسیت در برابر Minocycline و Doxycycline بهبود یافته و به جای حالت نیمه حساس، در برخی موارد به سطح حساسیت بالاتر ارتقا یافته است. این بهبود به ویژه در مقادیر منطقه رشد حساس برای نمونه‌های مختلف قابل مشاهده است؛ برای مثال، در نمونه شماره ۵، منطقه رشد حساس برای

Minocycline و Doxycycline افزایش یافته است به طور کلی، مقایسه این دو جدول نشان می‌دهد که استفاده از هسته انار می‌تواند تأثیر مثبتی بر کاهش مقاومت باکتریایی در برابر آنتی‌بیوتیک‌های مختلف داشته باشد و حضور عصاره باعث افزایش کارایی درمان‌های آنتی‌بیوتیکی است

جدول ۴. مقاومت آنتی‌بیوتیکی در برابر باکتری اسینتوباکتر بومانی در نمونه‌های مختلف بالینی بدون حضور عصاره هسته انار

نمونه باکتری اسینتوباکتر بومانی	سطح رشد (cfu/ml)	حساس	حساس (µg)	نیمه حساس
1 تراشه XDR	Light ≅100,000	Colistin	1.0 µg/ml	Minocycline
2 خلط XDR	Heavy	Colistin	1/5 µg/ml	
3 ادرار	Light ≅50,000 cfu/ml	Minocycline Doxycycline	≤17 µg ≤14 µg	
4 خلط	Moderate	Minocycline Doxycycline	≤16 µg ≤14 µg	
5 تراشه	≅Moderate ≅100/000 cfu/ml	Minocycline Doxycycline	≤16 µg	
6 خلط	Moderate	Minocycline Doxycycline	≤16 µg ≤13 µg	
7 تراشه	Heavy	Colistin	1/0 µg/ml	

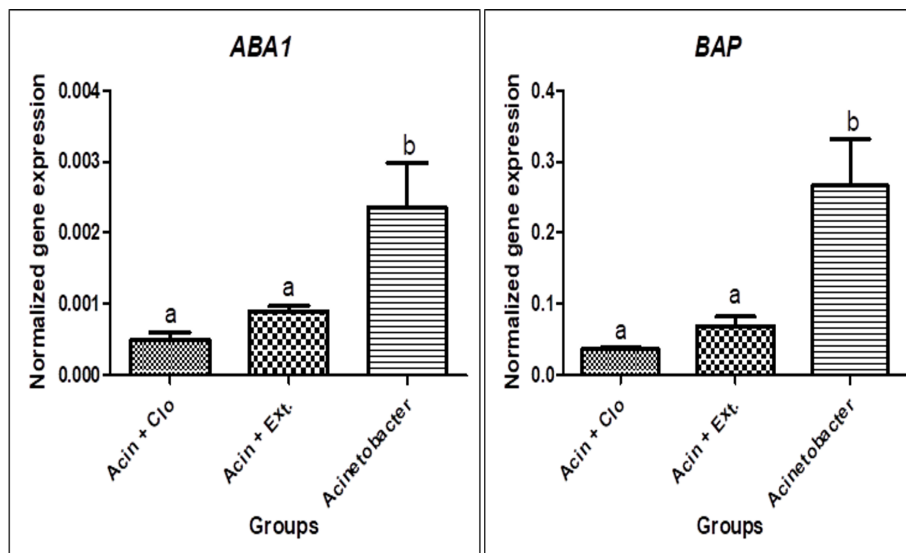
MIC Acinetobacter SPP → Doxycycline S≥13 , I 10_2 , R≤12, Minocycline S≥13 , I 13_5., R≤12, Colistin S≤2 , R≥4

جدول ۵. مقاومت آنتی‌بیوتیکی در برابر باکتری اسینتوباکتر بومانی در نمونه‌های مختلف بالینی با عصاره هسته انار

نمونه باکتری اسینتوباکتر بومانی	سطح رشد (cfu/ml)	حساس	حساس (µg)	نیمه حساس
1 تراشه XDR	Few	Colistin Minocycline	0/753 µg	
2 خلط XDR	≅ Heavy	Colistin	1/53 µg	Minocycline ≅143 µg
3 ادرار	≅Few	Minocycline Doxycycline	≤18 ≤17	
4 خلط	Light ≅50/000	Minocycline Doxycycline	≤17 ≤15	
5 تراشه	Light ≅50/000	Minocycline	≤173 µg	Doxycycline ≅123 µg
6 خلط	≅Moderate ≅100/000	Minocycline Doxycycline	≤163 µg ≤143 µg	
7 تراشه	Moderate <100/000	Colistin Minocycline	0/53 µg	Doxycycline ≅123 µg

در گروه *Acinetobacter* به طور معنی داری دارای میزان بیان بیشتری از ژن BAP است، در حالی که گروه‌های *Acin + Clo* و *Acin + Ext* بیان کمتری از این ژن دارند. بین *Acin + Clo* و *Acin + Ext* تفاوت معناداری در بیان ژن مشاهده نمی‌شود

شکل ۲ میزان بیان نسبی ژن *BAP* و *ABA1* را در سه گروه مختلف شامل اسینتوباکتر، اسینتو باکتر و عصاره هسته انار و اسینتوباکتر همراه با کلروگزیدین را نمایش می‌دهد. بر اساس این نمودار، گروه *Acinetobacter* دارای بیشترین میزان بیان ژن *ABA1* است که با گروه‌های *Acin + Clo* و *Acin + Ext* اختلاف معنی داری دارد



شکل ۲. میزان بیان نسبی ژن *BAP* و *ABA1* در سه گروه مختلف تیماری با استفاده از Real-Time PCR. حروف مشابه نشان دهنده عدم تفاوت معنی دار و حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار بین دو گروه است $p < 0.01$

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره هسته انار حاوی مجموعه‌ای گسترده از ترکیبات شیمیایی از جمله پروپاندیول، فوران کربوکسی آلدهید، هگزادکانوئید اسید، اکتادکانوئید اسید (استئاریک اسید) و کلروزوکسان است که دارای پتانسیل‌های ضد میکروبی قوی می‌باشند. همچنین، عصاره هسته انار باعث کاهش بیان ژنهای تشکیل بیوفیلم *BAP*, *ABA1* می‌شود که اثر آن مشابه ماده ضد عفونی کننده کلروگزیدین است. مطالعه Kopnik و همکاران در سال ۲۰۲۱ بر روی اثرات ضد عصاره آبی، آبی لیوفیلیزه، اتانولی و اتانولی لیوفیلیزه شده میوه، پوست و دانه انار تحقیق کردند. داده‌ها نشان داد که تمام عصاره‌ها خاصیت ضد باکتریایی هم بر روی باکتریهای گرم منفی (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Pseudomonas fluorescens*) و هم گرم مثبت (*Bacillus cereus*)

داشتند. در این بین پوست انار بیشترین خاصیت ضد باکتریایی را نشان داد که برحسب نوع باکتری و غلظت به کار رفته MIC_{90} را نشان داد. بررسی‌های آنزیماتیک، فعالیت α آمیلاز (در تمام عصاره‌ها) و پراکسیداز (فقط در عصاره اتانولی) هسته انار را ثابت کرد. در این پژوهش محتوای کل فنلی و پروآنتوسیانیدین‌ها در آب میوه، عصاره آبی و عصاره اتانولی (پوست و دانه) *Punica granatum* نیز تعیین شد (۲۰). عصاره‌های پوست انار به عنوان غنی ترین در محتوای متابولیت‌های ثانویه و پتانسیل آنتی اکسیدانی بسیار بالایی را نشان داد (تقریباً ۹۰٪ مهار فعالیت رادیکال آزاد). در مطالعه حاضر نیز مشخص شد که عصاره اتانولی هسته انار دارای خاصیت ضد باکتریایی است بطوریکه در تست دیسک دیفیوژن باعث کاهش قطر هاله رشد بر علیه باکتری گرم منفی

اسینتوباکتر بومانی مقاوم شد.

اخیرا در مطالعه ای (۲۰۲۴) تاثیر ضد میکروبی عصاره هیدروالکلی پوست انار در برابر میکروارگانیسم های MDR متعلق به گروه "ESKAPE" شامل انتروکوکوس فاسیوم، استافیلوکوکوس اورئوس، کلبسیلا پنومونیه، اسینتوباکتر بومانی، سودوموناس آئروژینوزا و انتروباکتر ارزیابی شد. این عصاره خاصیت ضد میکروبی در روش های کمی و نیمه کمی هم در خصوص باکتری های گرم منفی و هم گرم مثبت نشان داد که وابسته به دوز و زمان بود. غلظت آنتی بیوتیک کولیسیتین ۱۰ میکروگرم در هر دیسک بود که غلظت ۵ میکروگرم در هر دیسک عصاره فعالیت باکتری کشی مشابه با آن را در مورد باکتری اسینتوباکتر بومانی مقاوم به آنتی بیوتیک نشان داد. غلظت بالای عصاره خاصیت آنتی اکسیدانی داشت که یک اثر حفاظتی روی سیستم سلولی و غشاء گلبول های قرمز دارد. عصاره پوست انار اثر باکتریواستاتیک روی گونه های مقاوم کلینیکی اعمال کرد، بنابراین می تواند به عنوان یک ماده درمانی پیشنهاد شود (۲۱).

در مطالعه دیگری نیز اثر عصاره پوست انار روی اسینتوباکتر بومانی مقاوم به درمان بررسی شد که دوز ۴ میلی گرم بر کیلوگرم آن به طور معنی داری باعث

کاهش رشد و دوز ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم باعث مهار کامل رشد ایزوله ها شد (۲۲). نتایج مطالعه حاضر نیز اثر باکتریوسیدال و باکتریواستاتیک عصاره هسته انار را نشان داد

در مطالعه ای در تبریز در سال ۲۰۱۷، عصاره اتانولی دانه و پوست انار اثرات مهاري بر جدایه های بالینی *S. aureus* و *P. aeruginosa* نشان داد. حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) عصاره پوست و دانه انار به ترتیب ۱۲/۵ و ۲۵ میلی گرم در میلی لیتر بود. علاوه بر این، حداقل غلظت باکتری کشی (MBCs) عصاره پوست و دانه انار به ترتیب ۲۵ و ۵۰ میلی گرم در میلی لیتر بود که نشان دهنده فعالیت قوی تر عصاره پوست انار در خصوص این جدایه ها می باشد (۲۳)

تنوع ترکیبات نشان دهنده پتانسیل بالای هسته انار به تنهایی یا به صورت ترکیب با آنتی بیوتیکها در توسعه داروهای طبیعی جدید و مقابله با چالش های مقاومت آنتی بیوتیکی است. از محدودیتهای مطالعه می توان به محدودیت در تعداد نمونه به دلیل هزینه های مطالعه و محدودیت زمانی اشاره کرد. همچنین بهتر است در مطالعات آینده بر میزان سمیت عصاره بر روی سلولها بررسی صورت بگیرد

نتیجه گیری

کننده کلروهگزیدین نداشت. با توجه به نتایج حاضر، عصاره هسته انار می تواند به عنوان یک جایگزین یا تکمیل درمان های معمولی برای مقابله با عفونت های مقاوم به داروهای آنتی بیوتیکی مورد توجه قرار گیرد. این مطالعه می تواند پایه ای برای ادامه تحقیقات بیشتر و توسعه درمان های جدید در زمینه درمان عفونت های بیمارستانی باشد

در این مطالعه، عصاره هسته انار به عنوان یک منبع طبیعی با خواص ضد باکتریایی و ضد بیوفیلمی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از کروماتوگرافی نشان داد که عصاره هسته انار شامل مجموعه ای گسترده از ترکیبات شیمیایی است که هر کدام نقش مهمی در فعالیت ضد میکروبی دارند. همچنین، عصاره هسته انار باعث کاهش بیان ژنهای تشکیل بیوفیلیم BAP, ABA1 شد به طوریکه میزان بیان آن اختلاف معنی داری با ماده ضد عفونی

تشکر و قدردانی

از تمام کسانی که در انجام این تحقیق به ما یاری رسانند سپاسگزاریم.

تعارض منافع

نویسندگان این مقاله اعلام می کنند که هیچ تعارضی وجود ندارد.

References

1. Abdel-El-Haleem D. Acinetobacter: environmental and biotechnological applications. African journal of Biotechnology. 2003;2(4):71-4. DOI: 10.5897/AJB2003.000-1014
2. Oikonomou O, Sarrou S, Papagiannitsis CC, Georgiadou S, Mantzaris K, Zakyntinos E, Dalekos GN, Petinaki E. Rapid dissemination of colistin and carbapenem resistant Acinetobacter baumannii in Central Greece: mechanisms of resistance, molecular identification and epidemiological data. BMC infectious diseases. 2015;15:1-6. DOI: 10.1186/s12879-015-1297-x.
3. Rezai MS, Rafiei A, Ahangarkani F, Bagheri-Nesami M, Nikkhah A, Shafahi K, Eslami G, Hajalibeig A, Khajavi R. Emergence of extensively drug resistant acinetobacter baumannii-encoding integrons and extended-spectrum beta-lactamase genes isolated from ventilator-associated pneumonia patients. Jundishapur J Microbiol. 2017;10(7):e14377. DOI: 10.5812/jjm.14377.
4. Barari A, Noorbakhsh F, Honarmand Jahromi S, Phenotypic and molecular detection of AmpC-beta-lactamase in Acinetobacter baumannii strains isolated of clinical specimens. Journal of Biological Sciences 2021, 16(2):27-37. DOI: 10.30495/zisti.2023.1972119.1141.
5. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. Nature reviews microbiology. 2004;2(2):95-108. DOI: 10.1038/nrmicro821.
6. Emam AM, Ahmed MA, Tammam MA, Hala A, Zawam S. Isolation and structural identification of compounds with antioxidant, nematocidal and fungicidal activities from Punica granatum L. var. nana. International Journal of Scientific & Engineering Research. 2015;6(11):1023-40.
7. Türkylmaz M, Tağı Ş, Özkan M. Effects of Extraction Solvents on Polyphenol Contents, Antioxidant and Antibacterial Activities of Pomegranate Parts. Academic Food Journal/Akademik GIDA. 2017; 1;15(2).
8. Seeram NP, Adams LS, Henning SM, Niu Y, Zhang Y, Nair MG, Heber D. In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. The Journal of nutritional biochemistry. 2005;1;16(6):360-7. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2005.01.006.
9. Derakhshan Z, Ferrante M, Tadi M, Ansari F, Heydari A, Hosseini MS, Conti GO, Sadrabad EK. Antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic extract of pomegranate peels, juice and seeds. Food and chemical toxicology. 2018; 1;114:108-11. DOI: 10.1016/j.fct.2018.02.023.
10. Braga LC, Leite AA, Xavier KG, Takahashi JA, Bemquerer MP, Chartone-Souza E, Nascimento AM. Synergic interaction between pomegranate extract and antibiotics against Staphylococcus aureus. Canadian journal of microbiology. 2005; 1;51(7):541-7. DOI: 10.1139/w05-022.
11. Oikonomou O, Sarrou S, Papagiannitsis CC, Georgiadou S, Mantzaris K, Zakyntinos E, Dalekos GN, Petinaki E. Rapid dissemination of colistin and carbapenem resistant Acinetobacter baumannii in Central Greece: mechanisms of resistance, molecular identification and epidemiological data. BMC infectious diseases. 2015;15:1-6. DOI: 10.1186/s12879-015-1297-x.
12. Bakkiyaraj D, Nandhini JR, Malathy B, Pandian SK. The anti-biofilm potential of pomegranate (Punica granatum L.) extract against human bacterial and fungal pathogens. Biofouling. 2013 Sep 1;29(8):929-37. DOI: 10.1080/08927014.2013.820825.
13. Braga LC, Shupp JW, Cummings C, Jett M, Takahashi JA, Carmo LS, Chartone-Souza E, Nascimento AM. Pomegranate extract inhibits Staphylococcus aureus growth and subsequent enterotoxin production. Journal of ethnopharmacology. 2005; 4;96(1-2):335-9. DOI: 10.1016/j.jep.2004.08.034.
14. Panichayupakaranant P, Tewtrakul S, Yuenyongsawad S. Antibacterial, anti-inflammatory and anti-allergic activities of standardised pomegranate rind extract. Food Chemistry. 2010;15;123(2):400-3. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.04.054
15. Karimi M, Sadeghi R, Kokini J. Pomegranate as a promising opportunity in medicine and nanotechnology. Trends in food science & technology. 2017 Nov 1;69:59-73. DOI: 10.1016/j.tifs.2017.08.019
16. Rahimi S, Borhani K, Study of the prevalence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates and presence of vancomycin-resistant isolates in clinical samples. Iranian Journal of Biological Sciences 2023, 18(4):31-41. DOI: 10.71631/zisti.2023.1183120.
17. Alizadeh F, Ramezni M, Piravar Z, Effects of Stachys sylvatica hydroalcoholic extract on the ovary

and hypophysisgonadal axis in a rat with polycystic ovary syndrome. Middle East Fertility Society Journal 2020, 25(4):2-7. DOI: 10.1186/s43043-020-0015-9

18. As SG. CLSI based antibiogram profile and the detection of MDR and XDR strains of *Acinetobacter baumannii* isolated from urine samples. Medical journal of the Islamic Republic of Iran. 2019 Feb 8;33:3. DOI: 10.34171/mjiri.33.3.

19. Mackay IM. Real-time PCR in microbiology. Norfolk, UK: Caister Academic Press; 2007. DOI: 10.1111/j.1198-743x.2004.00722.x.

20. Kupnik K, Primožič M, Vasiček K, Knez Ž, Leitgeb M. A comprehensive study of the antibacterial activity of bioactive juice and extracts from pomegranate (*Punica granatum* L.) peels and seeds. Plants. 2021; 28;10(8):1554. DOI: 10.3390/plants10081554

21. Scaglione E, Sateriale D, Mantova G, Di Rosario M, Continisio L, Vitiello M, Pagliarulo C, Colicchio

R, Pagliuca C, Salvatore P. Antimicrobial efficacy of *Punica granatum* Lythraceae peel extract against pathogens belonging to the ESKAPE group. Frontiers in Microbiology. 2024;22;15:1383027. DOI: 10.3389/fmicb.2024.1383027.

22. Alqahtani A, Mohamed AA, Ahmad I, Alraey Y, Asiri M, Kopel J, Alshahrani MM. Pomegranate peel extract is an effective agent against MDR bacteria. Cellular and Molecular Biology. 2023;31;69(5):6-11. DOI: 10.14715/cmb/2023.69.5.2.

23. Nozohour, Y., Golmohammadi, R., Mirnejad, R. and Fartashvand, M. Antibacterial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) seed and peel alcoholic extracts on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from health centers. Journal of Applied Biotechnology Reports, 2018;5(1), 32-36. DOI: 10.29252/jabr.01.01.06