**Complementary Medicine Journal**
**Volume 13, Issue 4, Winter 2024**

**Research Article**

# Investigating the Antibacterial Properties of the Hydroalcoholic Extract of Pomegranate Peel and Phenol on a Group of Intestinal Bacteria in Vitro

Heydar Mousavi [1], Ehsan Mohammadzadeh [1], Hajar Badri [2], Esmail Najafi [3], Golchin Mousavi Tekantapeh [4], Shahram Nazari [2,*]

[1] Student Research Committee, Khalkhal University of Medical Sciences, Khalkhal, Iran
[2] Department of Environmental Health Engineering, Khalkhal University of Medical Sciences, Khalkhal, Iran
[3] Department of Public Health, Khalkhal University of Medical Sciences, Khalkhal, Iran
[4] Department of Environmental Health Engineering, School of Public Health, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran

*** Corresponding author:** Shahram Nazari, Department of Environmental Health Engineering, Khalkhal University of Medical Sciences, Khalkhal, Iran. E-mail: Shahramnazari73@yahoo.com

**DOI: 10.61186/cmja.13.4.65**

**How to Cite this Article:**
Mousavi H, Mohammadzadeh E, Badri H, Najafi E, Mousavi Tekantapeh G, Nazari SH. Investigating the Antibacterial Properties of the Hydroalcoholic Extract of Pomegranate Peel and Phenol on a Group of Intestinal Bacteria in Vitro. *Complement Med J*. 2024;**13**(4):65-73. DOI: 10.61186/cmja.13.4.65

**Received:** 14 Nov 2023
**Accepted:** 30 Dec 2023
**Keywords:**
Pomegranate Peel
Antibacterial Agent
Hydroalcoholic Extract
Intestinal Bacteria
Phenol
© 2024 Arak University of Medical Sciences

**Abstract**

**Introduction:** Pomegranate is a plant with an ancient history that has been widely used in medical sciences and its components have many properties. The aim of the present research is to synthesize pomegranate peel extract and investigate its antibacterial effects on a group of bacteria of intestinal bacteria and compare its antibacterial properties with phenol.

**Methods:** In this experimental study, pomegranate peel extract was extracted with the hydro alcoholic method. The Antibacterial effect of pomegranate peel extract was performed via disc diffusion and micro broth dilution methods on standard species of intestinal bacteria. All experiments were performed according to the guidelines of Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). This study has been registered with the ethical code IR.KHALUMS.REC.1402.006 in the Ethics Committee of Khalkhal Faculty of Medical Sciences.

**Results:** The MIC of pomegranate peel extract for *Shigella dysentery*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter aerogenes* bacteria were 12.5%, 12.5%, 25% and 6.25%, respectively. Also, the MBC of pomegranate peel extract for *Shigella dysentery*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia* and *Enterobacter aerogenes* bacteria were obtained 25%. The zone of inhibition for *Shigella dysentery*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter aerogenes* bacteria was 18, 19, 16 and 22, respectively.

**Conclusions:** The results of this study has been showed that the hydroalcoholic extract of the pomegranate peel is very effective in the removal of intestinal bacteria in vitro. Also extract than phenol in lower contact time cause killing these bacteria.

## Introduction

The use of herbal compounds to control infectious diseases dates back to a very long time ago, but with the advancement of medical science and the increase in the production of antibiotic drugs, the tendency to use these compounds has decreased (1, 2). In the early 20th century, the discovery of antimicrobial drugs, or antibiotics, was a historic turning point in the field of pharmaceuticals, which led to a dramatic reduction in the number of deaths from infectious diseases, which at the time were the leading cause of death worldwide(3, 4). In recent years, antibiotics have played an essential role in controlling infections, but their incorrect and excessive use has caused unwanted side effects and the creation of bacteria resistant to several drugs (5). Using high concentrations of

*Copyright © 2024 The Author(s); Published by Complementary Medicine Journal. This is an open access article, distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses /by-nc/4.0/) which permits others to copy and redistribute material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.*

antibiotics to destroy resistant bacteria causes poisoning and ultimately increases the percentage of deaths in patients (6). Therefore, measures should be taken to reduce side effects and bacterial resistance, and one of these ways is to discover new drugs based on herbal compounds that can be considered as a suitable alternative (7). Pomegranate is a plant with an ancient history that has been widely used in medical sciences and its components have many properties (8). Different parts of this plant such as seeds, bark, leaves and flowers have many chemical compounds such as phenolic compounds, sugars, amino acids, sterols, etc., which show different medicinal properties (9). The antimicrobial activity of pomegranate peel extract is due to the presence of phenolic substances, especially ellagic acid and punicalagin. These compounds are found in greater proportion in the peel of pomegranate fruit (10). The phenolic compounds present in pomegranate peel produce antimicrobial properties through several different mechanisms (11). The aim of the present research is to synthesize pomegranate peel extract and investigate its antibacterial effects on a group of bacteria of intestinal bacteria and compare its antibacterial properties with phenol.

**METHODS**

In this experimental study, pomegranate peel extract was extracted with the hydro alcoholic method. The Antibacterial effect of pomegranate peel extract was performed via disc diffusion and micro broth dilution methods on standard species of intestinal bacteria. All experiments were performed according to the guidelines of Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

**RESULTS**

The MIC of pomegranate peel extract for Shigella dysentery, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae and Enterobacter aerogenes bacteria were 12.5%, 12.5%, 25% and 6.25%, respectively. Also, the MBC of pomegranate peel extract for Shigella dysentery, Escherichia coli, Klebsiella pneumonia and Enterobacter aerogenes bacteria were obtained 25%. The zone of inhibition for Shigella dysentery, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae and Enterobacter aerogenes bacteria was 18, 19, 16 and 22, respectively.

**CONCLUSION**

This study has been registered with the ethical code IR.KHALUMS.REC.1402.006 in the Ethics Committee of Khalkhal Faculty of Medical Sciences.

**Ethical Considerations**

This study has been registered with the ethical code IR.KHALUMS.REC.1402.006 in the Ethics Committee of Khalkhal Faculty of Medical Sciences.

**Funding**

This article is the result of a research project approved by the student research committee and all the financial support of this research project was done by this committee.

**Authors' Contribution**

The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript. Ehsan Mohammadzadeh: Investigation, Conceptualization, Writing - original draft, Heydar Mousavi: Methodology, writing - review & editing, Hajar Badri: Conceptualization, Writing – original draft, Esmail Najafi: Resources, Visualization, Golchin Mousavi Tekantapeh: Investigation, Writing-original draft. Shahram Nazari: Supervision, Methodology.

**Conflict of Interest**

Authors declared no conflict of interest.

**Acknowledgments**

This study was supported via student research and technology Committee, Khalkhal University of Medical Sciences (grant number: IR-KH-1401-06-023 and Ethical Code: IR.KHALUMS. REC.1401.006).

**مجله طب مکمل**
**دوره ۱۳، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۲**

**مقاله پژوهشی**

# بررسی خصوصیات ضدباکتریایی عصاره هیدرو الکلی پوست انار و فنل بر روی گروهی از باکتری‌های روده‌ای در محیط آزمایشگاهی

حیدر موسوی [۱]، احسان محمدزاده [۱]، هاجر بدری [۲]، اسماعیل نجفی [۳]، گلچین موسوی تکانتپه [۴]، شهرام نظری [۵،*]

[۱] کارشناسی، گروه بهداشت عمومی، عضو کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده علوم پزشکی خلخال، خلخال، ایران
[۲] کارشناسی ارشد، گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده علوم پزشکی خلخال، خلخال، ایران
[۳] مربی، گروه بهداشت عمومی، دانشگاه علوم پزشکی خلخال، خلخال، ایران
[۴] کارشناسی، گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران
[۵] استادیار، گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده علوم پزشکی خلخال، خلخال، ایران
[*] **نویسنده مسئول:** شهرام نظری، استادیار، گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده علوم پزشکی خلخال، خلخال، ایران. ایمیل: Shahramnazari73@yahoo.com

**DOI: 10.61186/cmja.13.4.65**

**تاریخ دریافت:** ۱۴۰۲/۰۷/۱۸
**تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۲/۰۹/۲۵
**واژگان کلیدی:**
پوست انار
عامل ضد باکتریایی
عصاره هیدروالکلی
باکتری‌های روده‌ای
فنل

تمامی حقوق نشر برای دانشگاه علوم پزشکی اراک محفوظ است.

**چکیده**

**مقدمه:** انار گیاهی با سابقه کهن می‌باشد که کاربرد زیادی در علوم پزشکی داشته و اجزای آن به طور مجزا خواص متعددی دارند. هدف از پژوهش کنونی سنتز عصاره پوست انار و بررسی اثرات ضد باکتریایی آن بر روی گروهی از باکتری‌های روده‌ای و مقایسه خواص ضدباکتریایی آن با فنل می‌باشد.

**روش کار:** مطالعه به صورت تجربی در اردیبهشت ۱۴۰۲ در آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده علوم پزشکی خلخال انجام گردید. عصاره پوست انار با روش هیدرو الکلی استخراج گردید. اثر ضد باکتریایی عصاره پوست انار و فنل به روش انتشار دیسک و میکرو براث دایلوشن بر روی تعدادی از گونه‌های استاندارد از باکتری‌های روده‌ای انجام شد. تمامی آزمایشات بر اساس دستورکارهای موسسه استانداردهای آزمایشگاهی و بالینی (CLSI) انجام گردید. این مطالعه با کد اخلاق IR.KHALUMS.REC.1402.006 در کمیته اخلاق دانشکده علوم پزشکی خلخال به ثبت رسیده است.

**یافته‌ها:** مقدار حداقل غلظت بازدارندگی عصاره پوست انار برای باکتری‌های *شیگلا دیسانتری*، *اشرشیاکلی*، *کلبسیلا پنومونیه* و *آنتروباکتر آئروژنز* به ترتیب برابر ۱۲/۵٪، ۱۲/۵٪، ۲۵٪ و ۶/۲۵٪ بدست آورده شد. همچنین مقدار MBC عصاره پوست انار برای باکتری‌های *شیگلا دیسانتری*، *اشرشیاکلی*، *کلبسیلا پنومونی* و *آنتروباکتر آئروژنز* برابر ۲۵٪ بدست آمد. قطر هاله عدم رشد برای باکتری‌های *شیگلا دیسانتری*، *اشرشیاکلی*، *کلبسیلا پنومونیه* و *آنتروباکتر آئروژنز* به ترتیب ۱۸، ۱۹، ۱۶ و ۲۲ میلی متر بدست آمد.

**نتیجه گیری:** نتایج پژوهش کنونی نشان می‌دهد که عصاره هیدروالکلی پوست انار در حذف باکتری‌های روده‌ای بسیار مؤثر است. همچنین در زمان تماس کوتاه‌تر نسبت به فنل باعث حذف این باکتری‌ها می‌شود.

## مقدمه

استفاده از ترکیبات گیاهی برای کنترل بیماری‌های عفونی به زمان‌های خیلی دور بر می‌گردد ولی با پیشرفت علم پزشکی و گشترش تولید داروهای آنتی‌بیوتیکی گرایش به این ترکیبات کاهش پیدا کرده است (۱، ۲). در اوایل قرن بیستم کشف داروهای ضدمیکروبی یا آنتی بیوتیک‌ها نقطه عطف تاریخی در زمینه داروسازی بود که باعث کاهش چشم‌گیر مرگ و میر بیماری‌های عفونی شد که در آن زمان علت اصلی مرگ ومیر در سراسر جهان بشمار می‌رفت (۳، ۴). در سال‌های اخیر آنتی بیوتیک‌ها نقش اساسی در کنترل عفونت‌ها داشته‌اند ولی استفاده نادرست و بیش از حد آنها باعث ایجاد عوارض جانبی ناخواسته و ایجاد باکترهای مقاوم به چندین دارو شده است (۵). استفاده از غلظت‌های بالای آنتی‌بیوتیک‌ها برای از بین بردن باکتری‌های مقاوم، باعث ایجاد مسمومیت و نهایتاً باعث افزایش درصد مرگ و میر در بیماران می‌شود (۶). بنابراین بایستی اقداماتی به منظور کاهش عوارض جانبی و مقاومت باکتریایی صورت گیرد که یکی از این راه‌ها کشف داروهای جدید بر پایه‌ی ترکیبات گیاهی می‌باشد که می‌تواند یک جایگزین مناسب در نظر گرفته شود (۷).

انار گیاهی با سابقه دارویی کهن می‌باشد که تحقیقات روی خواص دارویی آن به خاطر نیاز روز افزون برای استفاده از مواد ضدمیکروبی طبیعی مشتق شده از منابع گیاهی در حال افزایش می‌باشد (۸). بخش‌های مختلف این گیاه همچون دانه، پوست، برگ و گل ترکیبات شیمیایی متعددی از قبیل ترکیبات فنلی، قندها، آمینواسیدها، استرول‌ها و...دارند که خواص دارویی متفاوتی از خود نشان می‌دهند

***Copyright ©*** *2024 The Author(s); Published by Complementary Medicine Journal. This is an open access article, distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses /by-nc/4.0/) which permits others to copy and redistribute material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.*

(۹). فعالیت ضدمیکروبی عصاره پوست انار به علت حضور مواد فنلیک بخصوص الاژیک اسید و پونیکالاژین می‌باشد. این ترکیبات با نسبت بیشتری در پوست میوه انار یافت می‌شوند (۱۰). ترکیبات فنلی موجود در پوست انار از طریق چند مکانیسم مختلف خاصیت ضدمیکروبی ایجاد می‌کنند. ترکیبات فنلی قادرند با پروتئین‌های سلولی باکتری‌ها واکنش داده و در ساختار و عملکرد دیواره سلولی تغییر ایجاد کنند و یا باعث دناتوره شدن برخی آنزیم‌های باکتری‌ها شوند. علاوه بر آن ترکیبات فنلی با برخی از مواد مغذی محیط مانند کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها، ویتامین‌ها و مواد معدنی تشکیل کمپلکس داده و آن‌ها را از دسترس باکتری‌ها خارج می‌کنند (۱۱). ظهور مقاومت به آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام به سال‌های اولیه کشف مقاومت نسبت به اولین آنتی بیوتیک (پنی سیلین) برمی گردد (۱۲). بتالاکتامازها آنزیم‌های تخریب کننده‌ای هستند که به آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام حمله می کنند. آنزیم‌های بتالاکتاماز در باکتری‌ها متنوع‌اند و دائماً در حال جهش هستند. تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز توسط خانواده آنتروباکتریاسه یکی از مشکلات مهم بهداشتی در سطح دنیاست (۱۳).

خانواده آنتروباکتریاسه به ویژه باکتری *اشرشیاکلی* و *کلبسیلا پنومونیه* باعث ایجاد انواعی از عفونت‌ها در افراد مختلف به ویژه نوزادان می‌شوند (۱۴)، که می‌توان به پنومونی (۱۵)، سپتی سمی (۱۶)، اسهال، ایجاد آبسه در کبد، اندوفتالمیت، مننژیت (۱۴)، عفونت‌های ادراری و باکتریایی (۱۷) اشاره نمود.

همچنین امروزه درمان عفونت نوزادان آلوده به ارگانیسم‌های مقاوم به چندین دارو، به یک مشکل مهم جهانی تبدیل شده است (۵) گونه‌های *شیگلا* باسیل‌های گرم منفی متعلق به خانواده انتروباکتریاسه هستند که به عنوان عامل اصلی اسهال و دیسانتری شناخته شده‌اند (۱۸). *شیگلا* یک مشکل عمده بهداشت عمومی در کشورهای در حال توسعه می‌باشد. شیگلوزیس یک بیماری منتقله از طریق غذا و یک خطر جدی در سلامت انسان است که توسط باکتری *شیگلا* ایجاد می‌شود (۱۹). در سطح جهانی شیگلوز سبب مرگ بیش از یک میلیون نفر در سال در میان تمام گروه‌های سنی در کشورهای در حال توسعه می‌گردد (۵). انتروباکتر یکی از اعضای خانواده آنتروباکتریاسه می‌باشد. دستگاه تنفسی و دستگاه ادراری شایع‌ترین مکان عفونت *انتروباکتر* است (۲۰). از میان اعضای این جنس *انتروباکترآئروژنز* به عنوان یک پاتوژن فرصت طلب شناخته شده است که همانند بسیاری از اعضای خانواده آنتروباکتریاسه قادر به ایجاد عفونت‌های دستگاه ادراری و عفونت‌های فرصت طلب در بیماران بستری شده در بیمارستان می‌باشد (۲۱).

درحال حاضر سویه‌های این باکتری به بتالاکتام‌ها، سفتازیدم و نورفلوکساسین مقاوم شده‌اند (۷, ۲۲).

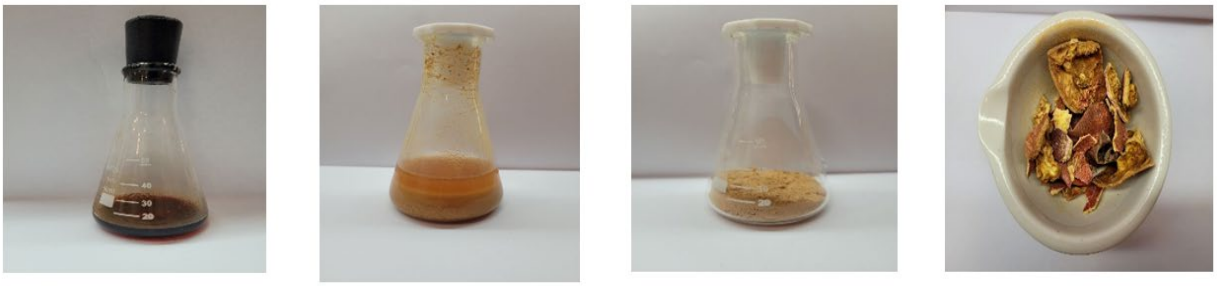
با توجه به نقش باکتری‌های نام‌برده درایجاد بیماری‌های عفونی و افزایش مقاومت آنها نسبت به آنتی بیوتیک‌ها دراثر مصرف داروهای ضدمیکروبی و از طرفی به دلیل کمتر بودن عوارض، سادگی استفاده و ارزان بودن گیاهان دارویی تحقیقات در این زمینه ضروری می‌باشد. تاکنون مطالعه‌ای در زمینه تعیین حداقل غلظت کشندگی، بازدارندگی، قطر هاله عدم رشد عصاره پوست انار و مقایسه آن با خاصیت ضد باکتریایی فنل بر روی باکتری‌های *شیگلا دیسانتری*، *انتروباکتر آئروژنز*، *کلبسیلا پنومونیه* و *اشرشیاکلی* انجام نشده است.

مقایسه خاصیت ضد باکتریایی مواد با فنل به عنوان شاخصی برای تعیین میزان اثر ضدباکتریایی آن معرفی شده است، که در مورد عصاره گیاهان ضروری است به این موضوع توجه و اهمیت داده شود. به همین دلیل در این مطالعه شاخص مذکور نیز مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت. بنابراین هدف از این مطالعه تعیین حداقل غلظت بازدارندگی، کشندگی و قطر هاله عدم رشد عصاره پوست انار و مقایسه آن با فنل بر روی باکتری‌های *شیگلا دیسانتری*، *انتروباکتر آئروژنز*، *کلبسیلا پنومونیه* و *اشرشیاکلی* در محیط آزمایشگاهی می‌باشد.

## روش کار

### تهیه عصاره پوست انار

پس از تهیه میوه انار از روستای نمهیل شهرستان خلخال واقع در استان اردبیل، پوست آن در محیط استریل آزمایشگاهی جدا و خشک گردید (شکل ۱ - الف). مقدار ۱۰ گرم از آن را در یک هاون استریل پودر کرده (شکل ۱ - ب)سپس آن را در یک ارلن مدرج ریخته و مقدار ۵۰ میلی لیتر اتانول ۱۰۰ درصد آزمایشگاهی به آن اضافه گردید (شکل ۱ - ج). سپس ۲۴ ساعت در دستگاه همزن مغناطیسی اختلاط داده شد. سپس با استفاده از قیف بوخنر دارای کاغذ صافی واتمن شماره ۴۲ و پمپ خلاء (مدل Spar Max TC501V)، اجزای باقی مانده از عصاره جدا گردید(شکل ۱ - د). سپس ۲۰ میلی لیتر آب مقطر به محلول مورد نظر اضافه و دوباره در دستگاه همزن مغناطیسی که دمای آن در ۸۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شده بود، قرار داده شد تا الکل به طور کامل از راکتور خارج شود (شکل ۱ - و). برای اطمینان از خارج شدن همه الکل افزوده شده، فرآیند تبخیر تا زمانی ادامه داده شد که حجم محلول ثابت گردد.



الف ب ج و

**شکل ۱.** مراحل تهیه عصاره پوست انار

### سویه‌های باکتری

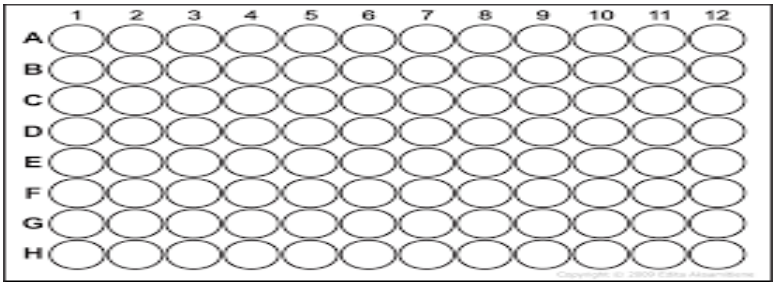
سویه‌های باکتری استفاده شده در پژوهش کنونی شامل سویه استاندارد *کلبسیلا پنومونیه* (ATCC:10031)، *اشرشیاکلی* (ATCC: 23591)، *شیگلا دیسانتری* (ATCC:12022)، *انتروباکتر آئروژنز* (ATCC:13048) می‌باشد که از مرکز پژوهش‌های صنعتی ایران تهیه گردید. تمامی سویه‌های باکتریایی خریداری شده، در محیط کشت نوترینت براث در شرایط هوازی و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرماگذاری شدند. سپس با لوپ استریل از محیط کشت نوترینت براث مقداری برداشته و بر روی محیط‌های کشت اختصاصی هر باکتری، به‌حالت خطی کشت داده شد. سپس پلیت‌های تلقیح شده در گرمخانه با دمای ۳۷ درجه سلسیوس به‌مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند (۲۳).

### تهیه استاندارد مک فارلند

در این پژوهش، استاندارد مک‌فارلند به‌عنوان مرجعی برای مطابقت دادن کدورت ناشی از سوسپانسیون باکتری استفاده شد. مواد مورد استفاده برای تهیه استاندارد نیم مک‌فارلند شامل: باریم کلرید ($BaCl_2.2H_2O$) دهیدراته و اسید سولفوریک ($H_2SO_4$) بوده که از شرکت Merck تهیه گردید. با مخلوط نمودن ۰/۰۵ میلی لیتر باریم کلرید دهیدارته ($BaCl_2.2H_2O$) ۱٪/۱۷۵ با ۹/۹۵ میلی لیتر اسید سولفوریک ($H_2SO_4$) ۱٪، استاندارد نیم مک‌فارلند تهیه گردید. با مخلوط این دو ترکیب رسوب سولفات باریم که سبب ایجاد کدورت در محلول می‌شود، به‌وجود آمد. جذب نوری کدورت ایجاد شده توسط محلول نیم‌مک فارلند در طول موج ۶۱۰ نانومتر به وسیله اسپکتروفتومتر (مدل Hach) اندازه گیری گردید. از آنجایی که تعداد باکتری تلقیح شده یکی از مهمترین متغیرهایی است که بر نتیجه این پژوهش اثر می‌گذارد، تراکم سوسپانسیون میکروبی تلقیحی باید استاندارد باشد. بدین‌منظور برای تهیه سوسپانسیون میکروبی، از کشت تازه و جوان باکتری با استفاده از لوپ استریل چند کلنی به لوله حاوی سرم فیزیولوژی استریل انتقال داده شد. کلنی‌های باکتری تا حدی به سرم فیزیولوژی اضافه گردید تا کدورت ایجاد شده توسط باکتری‌ها معادل با کدورت اندازه گیری شده در لوله استاندارد ۰/۵ مک فارلند باشد. با توجه به اینکه غلظت باکتریایی نیم مک فارلند برابر $1/5\times10^8$ میلی لیتر می‌باشد، برای بدست آوردن سایر رقت‌های باکتریایی از رقیق سازی استفاده گردید. این عملیات برای هر چهار باکتری مورد مطالعه به طور جداگانه انجام گردید. تمامی آزمایش‌ها برابر با دستورالعمل‌های موسسه استاندارد و آزمایشگاه پزشکی (CLSI) انجام شد (۲۴).

### تعیین حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی عصاره پوست انار

آزمایشات حداقل غلظت بازدارندگی MIC و MBC با استفاده از روش رقیق سازی میکرو بر اساس روش توصیه شده توسط CLSI انجام گردید. در این روش از میکرو چاهک‌ها (شکل ۲) برای تعیین اثر ضدباکتریایی غلظت‌های مختلف عصاره پوست انار استفاده گردید. یک چاهک شاهد برای کنترل مثبت و یک چاهک شاهد برای کنترل منفی استفاده شد. شاهد مثبت حاوی محیط کشت نوترینت براث و باکتری که ماده ضد باکتریایی به آن اضافه نشده است. همچنین شاهد منفی فقط حاوی محیط کشت می‌باشد. برای تعیین مقدار دقیق MIC و MBC عصاره پوست انار در مقابل هر باکتری، آزمایشات با رقت‌های مختلف (۵۰٪، ۲۵٪، ۱۲/۵٪، ۶/۲۵٪، ۳/۱۲۵٪ ...) عصاره به صورت رقیق سازی سریالی انجام داده شد. به چاهک‌های ردیف A (شکل ۲) که شامل ۱۲ چاهک می‌باشد، به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت نوترینت براث استریل ریخته شد سپس از عصاره تهیه شده، ۱۰۰ میکرولیتر به چاهک شماره A1 ریخته شد و چندین بار پیپت گردید و سپس از چاهک A1، ۱۰۰ میکرولیتر برداشت شد و به چاهک A2، انتقال داده شد، این عملیات رقیق سازی تا چاهک A10، انجام داده شد و غلظت عصاره پوست انار در خانه A10 به اندازه $(0/5)^{10}$ برابر غلظت اولیه کاهش یافت. چاهک‌های A11 و A12 به ترتیب به عنوان کنترل مثبت و کنترل منفی در نظر گرفته شد. سپس ۵ میکرولیتر از محلول باکتری با غلظت یک دهم برابر نیم مک فارلند به همه چاهک‌ها به جزء چاهک کنترل منفی اضافه گردید. سپس میکروپلیت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در گرمخانه قرار داده شد. پس از طی زمان گرماگذاری، چاهک‌ها از نظر کدورت ناشی از رشد باکتری تلقیح شده بررسی شدند. چاهکی با کمترین غلظت از عصاره پوست انار که رشد باکتری در آن مشاهده نشد، به عنوان MIC تعیین گردید. برای تعیین MBC عصاره پوست انار، از چاهک‌هایی که رشد در آنها مشاهده نشده بود ۱۰ میکرولیتر بر روی محیط کشت نوترینت آگار کشت داده شدند و در گرمخانه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شدند. بعد از گرماگذاری پلیت مربوط به چاهکی که حاوی کمترین غلظت از عصاره پوست انار در آن بود و رشد باکتری برابر یا کمتر از ۱۱ کلنی در آن مشاهده شد، به عنوان MBC در نظر گرفته شد. تمامی این عملیات در زیر هود استریل انجام گردید.




**شکل ۲.** میکرو چاهک‌ها برای تعیین MIC و MBC

### روش دیسک آگار دیفیوژن

از کدورت سوسپانسیون میکروبی تهیه شده مطابق با استاندارد نیم مک فارلند در پلیت‌های حاوی محیط کشت نوترینت آگار بوسیله‌ی سواپ استریل به صورت یکنواخت کشت داده شدند، سپس دیسک‌های خالی (Blank disk) ۶ میلی متری در شرایط کاملاً استریل به ۵۰ میکرولیتر از عصاره آغشته و به منظور خشک شدن به مدت ۳۰ دقیقه در گرمخانه در دمای ۳۰ درجه سلسیوس قرار داده شدو سپس دیسک‌ها در داخل پلیت‌ها به فاصله مناسب قرار گرفته و پس از گرمخانه گذاری به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، قطر هاله‌ی عدم رشد بوسیله خط کش برای هر کدام از آنها اندازه‌گیری و بر حسب میلیمتر گزارش گردید. تمامی این عملیات برای سویه‌های باکتریایی مورد مطالعه به صورت جداگانه انجام گردید.

برای همه نمونه‌های مورد آزمایش یک نمونه به عنوان نمونه شاهد استفاده گردید (حاوی محیط کشت نوترینت براث و باکتری‌ها، بدون عصاره پوست انار). تمامی آزمایشات حذف باکتری‌ها در محیط آبی با خصوصیات PBS انجام گردید (جدول ۱).

**جدول ۱.** خصوصیات بافر فسفات نرمال سالین

| PBS, 0.01 M | |
|---|---|
| **NaCl** | ۸ گرم |
| **KCl** | ۰/۲ گرم |
| **Na2HPO4 7H2O** | ۲/۱۷ گرم |
| **KH2PO4** | ۰/۲۵۹ گرم |
| **آب مقطر** | ۱ لیتر |

### مقایسه خواص ضد باکتریایی عصاره پوست انار با فنل

به منظور مقایسه عصاره پوست انار با فنل طبق روش MIC و MBC، رقت‌های یک دوم، یک چهارم، یک هشتم، یک شانزدهم، یک سی و دوم، یک شصت و چهارم، یک صد و بیست و هشتم، یک دویست و پنجاه و ششم عصاره پوست انار تهیه و همچنین فنل مادر که از شرکت مرک خریداری شده بود با غلظت‌های مختلف (۵۰۰۰، ۲۵۰۰، ۱۲۵۰ و ۶۷۵ میلی‌گرم در لیتر) در لوله‌های آزمایش تهیه گردید. فنل مادر از شرکت مرک خریداری شد. به هر کدام از چاهک‌ها تعداد معینی از باکتری‌های (۷/۵×۱۰۴ CFU/ml) مورد آزمایش اضافه شد. سپس در زمان‌های ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه نمونه‌ای به اندازه ۱۰ میکرولیتر از هر یک چاهک برداشته شد و در محیط کشت نوترینت آگار کشت داده شد. و سپس در دستگاه انکوباتور به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد. پس از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتیگرداد نمونه‌ها از نظر رشد تعداد باکتری‌ها مورد مقایسه قرار گرفتند.

## یافته‌ها

### تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC)

مقدار MIC و MBC عصاره پوست انار برای باکتری‌های *شیگلا دیسانتری* و *اشرشیاکلی* به ترتیب در رقت‌های ۱۲/۵٪ و ۲۵٪، *کلبسیلا پنومونیه* در رقت ۲۵٪ و آنتروباکتر *آئروژنز* به ترتیب در رقت‌های ۶/۲۵٪ و ۲۵٪ بدست آورده شد. در جدول ۲ اثرات ضدباکتریایی رقت‌های مختلف عصاره پوست انار بر روی باکتری‌های مورد نظر نشان داده شده است.

**جدول ۲.** تأثیر رقت‌های مختلف عصاره پوست انار بر رشد باکتری

| رقت عصاره پوست انار | تأثیر بر رشد باکتری‌ها | | | |
|---|---|---|---|---|
| | شیگلا دیسانتری | اشرشیاکلی | کلبسیلا پنومونیه | انتروباکتر آئروژنز |
| ٪ ۵۰ | باکتری کشی | باکتری کشی | باکتری کشی | باکتری کشی |
| ٪ ۲۵ | MBC | MBC | MIC و MBC | MBC |
| ٪ ۱۲/۵ | MIC | MIC | رشد | بازدارندگی |
| ٪ ۶/۲۵ | رشد | رشد | رشد | MIC |
| ٪ ۳/۱۲۵ | رشد | رشد | رشد | رشد |
| **شاهد (کنترل منفی)** | عدم رشد | عدم رشد | عدم رشد | عدم رشد |
| **شاهد (کنترل مثبت)** | رشد | رشد | رشد | رشد |

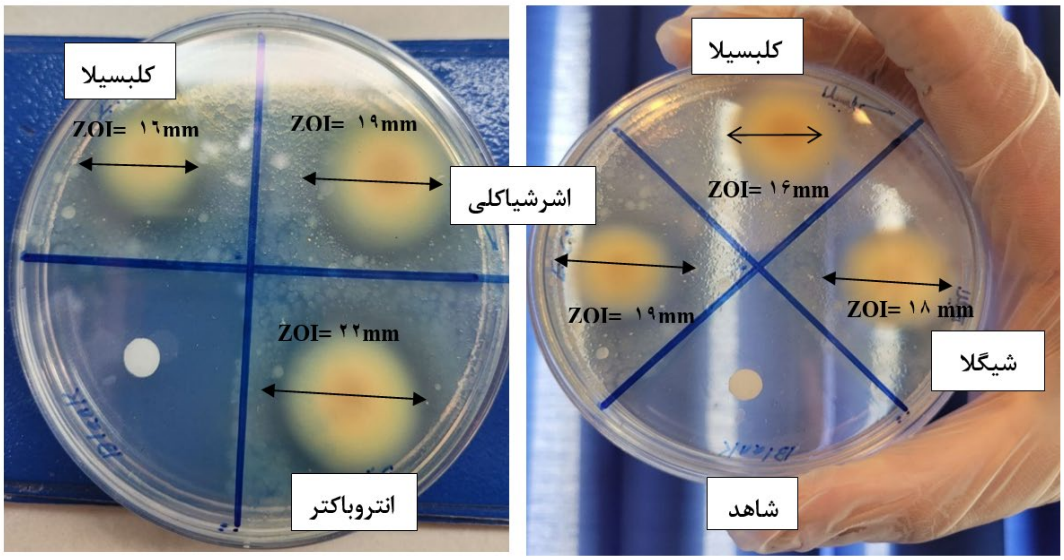
### تعیین قطر هاله عدم رشد (ZOI)

قطر هاله عدم رشد برای باکتری‌های *شیگلا دیسانتری*، *اشرشیاکلی*، *کلبسیلا پنومونیه* و *آنتروباکتر آئروژنز* به ترتیب ۱۸، ۱۹، ۱۶ و ۲۲ میلی متر بدست آمد (شکل ۳).

### نتایج مقایسه خواص ضد باکتریایی عصاره پوست انار با فنل

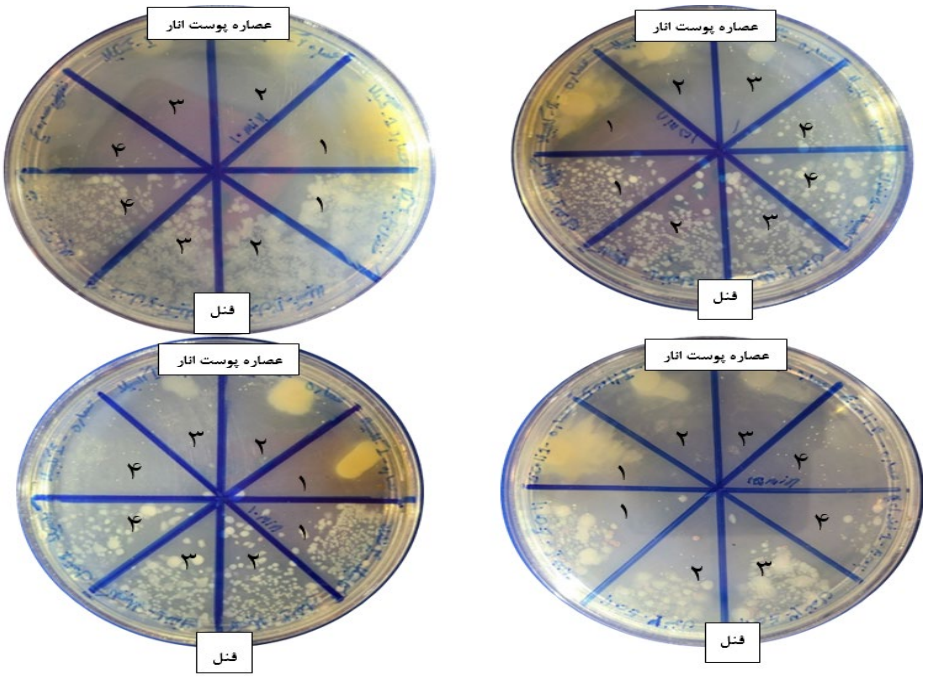
در مقایسه‌ی اثر ضد باکتریایی عصاره پوست انار با فنل مشاهده شد که عصاره پوست انار بر روی باکتری‌های *اشرشیاکلی* در زمان‌های ۵ و ۱۰ دقیقه تماس، در رقت ۶/۲۵٪ و ۱۵ دقیقه تماس در رقت ۱۲/۵٪ اثر کشندگی داشت در حالی که فنل در این بازه‌های زمانی اثر کشندگی نداشته (تعداد کلنی‌ها غیر قابل شمارش بود) و فقط در ۱۵ دقیقه تماس در رقت ۵۰۰۰ میلی گرم بر لیتر باعث کاهش تعداد کلنی باکتری به ۶۸ کلنی شده بود. در مورد باکتری‌های *شیگلا دیسانتری* در زمان‌های ۵ و ۱۰ و ۱۵ دقیقه تماس، عصاره پوست انار در رقت ۶/۲۵٪ اثر کشندگی داشت در حالی که فنل در این بازه‌های زمانی اثر کشندگی نداشت. همچنین عصاره پوست انار بر روی باکتری‌های *کلبسیلا پنومونیه* در زمان‌های ۵ و ۱۰ دقیقه تماس در رقت ۱۲/۵٪ و در ۱۵ دقیقه تماس در رقت ۲۵٪ اثر کشندگی از خود نشان داد در حالی که فنل در این بازه‌های زمانی اثر کشندگی نداشت. همچنین عصاره پوست

انار بر روی باکتری‌های *انتروباکتر آئروژنز* در زمان ۵ دقیقه تماس در رقت ۶/۲۵٪ و در زمان‌های ۱۰ و ۱۵ دقیقه تماس در رقت ۱۲/۵٪ اثر کشندگی داشت در حالی که فنل در این بازه‌های زمانی اثر کشندگی نداشت (شکل ۴).




(ب) (الف)

**شکل ۳.** قطر هاله عدم رشد باکتری‌های *شیگلا دیسانتری*، *کلبسیلا پنومونیه* و *انتروباکتر آئروژنز* (الف) و *اشرشیا کلی* (ب)




**شکل ۴.** نمونه‌ای از تصاویر مربوط به مقایسه خاصیت ضدباکتریایی عصاره پوست انار با فنل

## بحث

در مطالعه حاضر با افزایش غلظت عصاره پوست انار میزان رشد باکتری ها کاهش یافت. نتایج حاصل از MIC و MBC نشان می‌دهد که حساس‌ترین باکتری به عصاره پوست انار در بین باکتری‌های مورد مطالعه *انتروباکتر آئروژنز* و مقاوم‌ترین آن *کلبسیلا پنومونیه* می‌باشد. به طوری که عصاره پوست انار در رقت ۶/۲۵٪ بر روی باکتری‌های *انتروباکتر آئروژنز* اثر بازدارندگی و در رقت ۲۵٪ اثر کشندگی داشت در حالی که عصاره در رقت ۲۵٪ بر روی باکتری‌های کلبسیلا پنومونیه اثر بازدارندگی و کشندگی داشت. همچنین میزان حساسیت باکتری‌های *اشرشیاکلی* با *شیگلا دیسانتری* تقریباً برابر بدست آمد. بطوری که حداقل غلظت بازدارندگی عصاره پوست انار بر روی هر دو باکتری در رقت ۱۲/۵٪ و حداقل غلظت کشندگی آن در رقت ۲۵٪ بدست آمد. تفاوت بین حساسیت و مقاومت باکتری‌های متعلق به یک خانواده

ممکن است به دلیل تفاوت در ساختارهای موجود در غشاء و یا آنزیم‌های تولیدی توسط باکتری بر علیه آنتی‌بیوتیک مورد استفاده باشد. نتایج به دست آمده از آزمایش هاله عدم رشد هم با نتایج MIC و MBC مطابقت دارد. در این آزمایش هم باکتری‌های *انتروباکتر آئروژنز* حساس‌ترین وکلبسیلا پنومونیه مقاوم‌ترین باکتری در بین باکتری‌های مورد بررسی بدست آمد. بطوری که قطر هاله عدم رشد برای باکتری‌های *انتروباکتر آئروژنز* ۱۳ میلی‌متر و برای باکتری‌های *کلبسیلا پنومونیه* ۱۳ میلی متر بدست آمد. اندازه قطر هاله عدم رشد باکتری‌های *اشرشیاکلی* (۱۴ میلی‌متر) و *شیگلا دیسانتری* (۱۵ میلی متر) مطابق با نتایج MIC و MBC نشان می‌دهد *اشرشیا کلی و شیگلا دیسانتری* از لحاظ حساسیت و مقاومت به عصاره تقریباً برابر هستند. در صورتی که نتایج MIC و MBC با نتایج قطر هاله عدم رشد برابر نبود. به دلیل کمی بودن روش MIC و MBC استناد به نتایج این آزمایشات نسبت به روش قطر هاله عدم رشد که روشی کیفی کیفی محسوب می‌شود، پیشنهاد می‌شود. حسین عبدو و همکارانش در سال ۲۰۲۰ پژوهشی تحت عنوان تجزیه و تحلیل پلی فنل‌ها، فلاونوئیدها و فعالیت ضد میکروبی در عصاره پوست انار انجام دادند. فعالیت ضد میکروبی چهار غلظت مختلف آماده شده از چهار عصاره پوست انار بر روی دو باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سودوموناس آئروژنوزا*، باکتری گرم منفی *اسینتوباکتر بومانی* و قارچ *کاندیدا پاراپسیلوزیس* بررسی شد. نتایج نشان داد که عصاره استونی به ترتیب دارای بیشترین مقدار پلی‌فنل کل و محتوای فلاونوئید کل در مقایسه با متانول بوده و فعالیت ضد میکروبی عصاره استونی بر روی همه میکروارگانیسم‌ها بالاترین مقدار و پس از آن عصاره متانول و اتانول است (۲۵). همچنین در مطالعه‌ای دیگر رهنمون و همکارانش در سال ۲۰۱۶ تأثیر شرایط استخراج بر میزان ترکیبات فنلی و خاصیت ضدمیکروبی عصاره پوست انار را بررسی کردند. در این پژوهش قدرت ضدمیکروبی عصاره‌های استخراج شده علیه چند میکروارگانیسم شاخص در مواد غذایی شامل *سالمونلا اینتریتیدیس*، *اشریشیاکلی*، *لیستریا مونوسیتوژنز*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *آسپرژیلوس نایجر* و *ساکارومایسس سرویزیه* با روش انتشار دیسک تعیین شد. نتایج نشان داد عصاره استخراج شده در نسبت ۶۰ به ۴۰ اتانول به آب، دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و زمان ۲۴ ساعت، بیشترین بازدهی استخراج و نیز قویترین خاصیت ضدمیکروبی به دست آمد (۲۶). مقایسه خاصیت ضد باکتریایی مواد با فنل به عنوان شاخصی برای تعیین میزان اثر ضدباکتریایی آن معرفی شده است، که در مورد عصاره گیاهان ضروری است به این موضوع توجه و اهمیت داده شود. به همین دلیل در این مطالعه شاخص مذکور نیز مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت. در این آزمایش مقاوم‌ترین باکتری همانند نتایج آزمایشات قبلی *کلبسیلا پنومونیه* و حساست ترین باکتری بر خلاف آزمایشات قبل، *شیگلا دیسانتری* بدست آمد. بطوری که عصاره پوست انار در مقایسه با فنل بر روی باکتری‌های *انتروباکتر آئروژنز* در زمان ۵ دقیقه تماس در رقت ۶/۲۵٪ و در زمان‌های ۱۰ و ۱۵ دقیقه تماس در رقت ۱۲/۵٪ اثر کشندگی داشت اما فنل در این بازه‌های زمانی اثر کشندگی نداشت. همچنین عصاره پوست انار بر روی باکتری‌های *شیگلا دیسانتری* در زمان‌های ۵ و ۱۰ و ۱۵ دقیقه تماس در رقت ۶/۲۵٪ اثر کشندگی داشت اما فنل در این بازه‌های زمانی اثر کشندگی نداشت. علت متفاوت بودن مقاوم‌ترین و حساس‌ترین باکتری در بین باکتری‌های مورد مطالعه در روش مقایسه اثر ضدباکتریایی عصاره پوست انار با فنل با نتایج حاصل از آزمایشات MIC، MBC و قطر هاله عدم رشد به کاهش زمان مواجهه باکتری با عصاره مربوط می‌شود.

عصاره پوست انار اثرات ضد باکتریایی خود را از طریق تغییر ساختار و عملکرد غشای باکتری با افزایش نفوذ پذیری آن اعمال می‌کند که باعث متورم شدن غشاء شده و در نهایت باعث مرگ باکتری می‌شود. اثرات ضدباکتریایی این عصاره معمولاً به دلیل وجود مقادیر زیاد الاژیک اسید و پونیکالاژین در عصاره می‌باشد که علاوه بر باکتری‌های گرم منفی بر روی باکتری‌های گرم مثبت نیز اثر ضد باکتریایی دارد. اما میزان تأثیر بر روی باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی کمتر است (۲۷). این به دلیل وجود لایه ضخیم پپتیدوگلیکان در باکتری‌های گرم مثبت می‌باشد، که منجر می‌شود آنتی‌بیوتیک‌ها نفوذپذیری کمتری از غشا باکتری به داخل سلول و در نهایت مرگ سلولی داشته باشد. حبیب پور و همکارانش در سال ۲۰۱۵ در مطالعه‌ای اثر غلظت‌های مختلف عصاره پوست انار بر روی تشکیل بیوفیلم باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* را بررسی کردند. در این مطالعه تجربی میزان اثر ضد بیوفیلمی، میزان درصد کاهش تشکیل بیوفیلم و سنتیک رشد باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* در تیمارهای مختلف به روش رقیق سازی میکرو و رنگ سنجی با کریستال ویوله اندازه‌گیری شد. یافته‌ها نشان داد که در تمامی تیمارها در شش ساعت اول باکتری قادر به تولید بیوفیلم نبوده و در تیمار ۱۲ ساعته با غلظت‌های ۰/۰۱ و ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر و در تیمارهای ۱۸ و ۲۴ ساعته با غلظت ۰/۰۰۱ میلی گرم در لیتر عصاره پوست انار به ترتیب تأثیر بازدارندگی تشکیل بیوفیلم متوسط و قوی مشاهده شد (۲۸). همچنین الزورکی و همکارانش در سال ۲۰۰۹ در مطالعه‌ای فعالیت ضد میکروبی پوست انار را بررسی کردند. فعالیت ضد میکروبی در برابر برخی از پاتوژن‌های منتقله از غذا توسط عصاره پوست میوه انار با استفاده از روش آزمایشگاهی دیسک انتشاری ارزیابی شد. عصاره متانولی ۸۰ درصد استخراج شده از پوست انار یک بازدارنده قوی در برابر *لیستریا مونوسیتوژنز*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیاکلی* و *یرسینیا انتروکولیتیکا* بود. حداقل غلظت مهارکنندگی این عصاره در برابر *سالمونلا انتریتدیس* ۴ میلی‌گرم بر لیتر بود. مطالعه حاظر با تحقیقات انجام شده در زمینه ارزیابی خصوصیات ضدباکتریایی عصاره پوست انار مطابقت دارد.

از نتایج مطالعه حاضر می‌توان پی برد که کارایی غلظت های مختلف عصاره پوست انار در مهار رشد و کشتن باکتری‌های گرم منفی مورد مطالعه متفاوت می‌باشد. همچنین در زمان تماس کوتاه‌تر نسبت به فنل باعث حذف این باکتری‌ها می‌شود. اما اثبات فعالیت ضد باکتریایی عصاره پوست انار بر روی این پاتوژن‌های بیماری‌زا این امیدواری را ایجاد نمود تا بتوان این ماده یا ترکیبات آن را به عنوان یک داروی ضد باکتریایی مناسب مدنظر قرار داده و با انجام تحقیقات بیشتر به عنوان جایگزینی برای داروهای ضدباکتریایی دارای مورد استفاده قرار داد. انجام تحقیقات بیشتر روی طیف وسیع‌تری از باکتری‌های گرم منفی پاتوژن و متعاقب آن تحقیق در نمونه‌های بالینی و بیماران مبتلا به عفونت‌های باکتریایی، از جمله موارد اصلی برای نیل به این هدف

خواهد بود. بنابراین در مطالعات بعدی پیشنهاد می‌شود اثرات این مواد را بر روی طیف وسیع‌تری از باکتری‌ها انجام داده و در صورت امکان، ارزیابی اقتصادی برای سنتز و کاربرد گستره آن صورت گیرد.

## سپاسگزاری

بدینوسیله از ریاست محترم، معاونت و کمیته تحقیقات و فناوری دانشجویی دانشکده علوم پزشکی و خدمات بهداشتی و درمانی خلخال بخاطر حمایت‌های مالی و معنوی صمیمانه تقدیر و تشکر می‌نماییم. این طرح تحقیقاتی دارای کد اخلاق در پژوهش به شماره IR.KHALUMS.REC.1402.006و کد طرح پژوهشی به شماره IR-KHS-1402-02- 59 می‌باشد.

## References


1. Jahani S, Saeidi S, Javadian F, Akbarizadeh Z, Sobhanizade A. Investigating the antibacterial effects of plant extracts on Pseudomonas aeruginosa and Escherichia coli. *Int J Infect*. 2016;**3**(2). **doi:** 10.17795/iji-34081
2. Van Wyk BE, Wink M. Medicinal plants of the world: Cabi;2018.
3. Huh AJ, Kwon YJ. "Nanoantibiotics": a new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. *J Control Release*. 2011;**156**(2):128-145. **doi:** 10.1016/j.jconrel.2011.07.002 **pmid:** 21763369
4. Petrovska BB. Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacogn Rev*. 2012;**6**(11):1-5. **doi:** 10.4103/0973-7847.95849 **pmid:** 22654398
5. Eghbal GM, Borji A, Naghavi A, Zangiabadi M, Bokaeian M. Antimicrobial resistance of shigella species isolated from diarrheal patients in zahedan. 2009.
6. Drummond RA, Desai JV, Ricotta EE, Swamydas M, Deming C, Conlan S, et al. Long-term antibiotic exposure promotes mortality after systemic fungal infection by driving lymphocyte dysfunction and systemic escape of commensal bacteria. *Cell Host Microbe*. 2022;**30**(7):1020-1033 e1026. **doi:** 10.1016/j.chom.2022.04.013 **pmid:** 35568028
7. Bornet C, Davin-Regli A, Bosi C, Pages JM, Bollet C. Imipenem resistance of enterobacter aerogenes mediated by outer membrane permeability. *J Clin Microbiol*. 2000;**38**(3):1048-1052. **doi:** 10.1128/JCM.38.3.1048-1052.2000 **pmid:** 10698994
8. Malviya S, Arvind, Jha A, Hettiarachchy N. Antioxidant and antibacterial potential of pomegranate peel extracts. *J Food Sci Technol*. 2014;**51**(12):4132-4137. **doi:** 10.1007/s13197-013-0956-4 **pmid:** 25477693
9. Mirjalili A. A review on biochemical constituents and medicinal properties of pomegranate (Punica granatum L.). *J Med Plant*. 2015;**14**(56):1-22.
10. Mphahlele RR, Fawole OA, Makunga NP, Opara UL. Effect of drying on the bioactive compounds, antioxidant, antibacterial and antityrosinase activities of pomegranate peel. *BMC Complement Altern Med*. 2016;**16**:143. **doi:** 10.1186/s12906-016-1132-y **pmid:** 27229852
11. Salahvarzi Y, Tehranifar A, Jahanbakhsh V. Relation of antioxidant and antifungal activity of different parts of pomegranate (Punica granatum L.) extracts with its phenolic content. *Iran J Med Aromatic Plant*. 2011;**27**(1).
12. Masjedian F, Valehi F, Talebi A, Rastegar Lari A. Evaluation of wide broad spectrum antibiotic resistance of E. coliand Klebsiella pneumonia. *Iran J Med Microbiol*. 2007;**1**(2):27-34.
13. Ibrahim M, Bahout A, Ayoub M, El-Said EI, Abd ElAal SF. Chemical and Microbiological Evaluation of Raw Buffalo Milk Locally Produced in Sharkia Governorate. *Zagazig Veterinar J*. 2019;**47**(4):352-363. **doi:** 10.21608/zvjz.2019.14075.1051
14. Yang J, Ye L, Wang W, Luo Y, Zhang Y, Han L. Diverse prevalence of 16S rRNA methylase genes armA and rmtB amongst clinical multidrug-resistant Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae isolates. *Int J Antimicrob Agents*. 2011;**38**(4):348-351. **doi:** 10.1016/j.ijantimicag.2011.04.021 **pmid:** 21724374
15. Navidinia M, Karimi A, Rahbar M, Fallah F, Ahsani RR, Malekan MA, et al. Study Prevalence of Verotoxigenic E.coli Isolated from Urinary Tract Infections (UTIs) in an Iranian Children Hospital. *Open Microbiol J*. 2012;**6**:1-4. **doi:** 10.2174/1874285801206010001 **pmid:** 22291863
16. Roy S, Viswanathan R, Singh AK, Das P, Basu S. Sepsis in neonates due to imipenem-resistant Klebsiella pneumoniae producing NDM-1 in India. *J Antimicrob Chemother*. 2011;**66**(6):1411-1413. **doi:** 10.1093/jac/dkr068 **pmid:** 21393155
17. Padilla E, Llobet E, Domenech-Sanchez A, Martinez-Martinez L, Bengoechea JA, Alberti S. Klebsiella pneumoniae AcrAB efflux pump contributes to antimicrobial resistance and virulence. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;**54**(1):177-183. **doi:** 10.1128/AAC.00715-09 **pmid:** 19858254
18. Ferreccio C, Prado V, Ojeda A, Cayyazo M, Abrego P, Guers L, et al. Epidemiologic patterns of acute diarrhea and endemic Shigella infections in children in a poor periurban setting in Santiago, Chile. *Am J Epidemiol*. 1991;**134**(6):614-627. **doi:** 10.1093/oxfordjournals.aje.a116134 **pmid:** 1951266
19. Kosek M, Yori PP, Pan WK, Olortegui MP, Gilman RH, Perez J, et al. Epidemiology of highly endemic multiply antibiotic-resistant shigellosis in children in the Peruvian Amazon. *Pediatrics*. 2008;**122**(3):e541-549. **doi:** 10.1542/peds.2008-0458 **pmid:** 18710884
20. Davin-Regli A, Pages JM. Enterobacter aerogenes and Enterobacter cloacae; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. *Front Microbiol*. 2015;**6**:392. **doi:** 10.3389/fmicb.2015.00392 **pmid:** 26042091
21. Zhang C, Lv FX, Xing XH. Bioengineering of the Enterobacter aerogenes strain for biohydrogen production. *Bioresour Technol*. 2011;**102**(18):8344-8349. **doi:** 10.1016/j.biortech.2011.06.018 **pmid:** 21764301
22. Abbasi E, Javaheri J, Momeni H, Ghaznavi-Rad E. High Prevalence of Extended Spectrum Beta-Lactamase Resistance of Shigella Species in Diarrhea Samples in Khomein, Iran. *J Arak Univ Med Sci*. 2019;**22**(2):75-83.
23. Rastegar A, Nazari S, Allahabadi A, Falanji F, Akbari Dourbash FAD, Rezai Z, et al. Antibacterial activity of amino- and amido-terminated poly (amidoamine)-G6 dendrimer on isolated bacteria from clinical specimens and standard strains. *Med J Islam Repub Iran*. 2017;**31**:64. **doi:** 10.14196/mjiri.31.64 **pmid:** 29445693
24. Humphries RM, Ambler J, Mitchell SL, Castanheira M, Dingle T, Hindler JA, et al. CLSI Methods Development and Standardization Working Group Best Practices for Evaluation of Antimicrobial Susceptibility Tests. *J Clin Microbiol*. 2018;**56**(4). **doi:** 10.1128/JCM.01934-17 **pmid:** 29367292
25. Abdu OH, Saeed AA, Fdhel TA. Polyphenols/flavonoids analysis and antimicrobial activity in pomegranate peel extracts. *Elect J Univ Aden Basic Appl Sci*. 2020;**1**(1):14-19. **doi:** 10.47372/ejua-ba.2020.1.4
26. Rahnemoon P, Sarabi JM, Javanmard DM, Bostan A. Evaluation of extraction conditions on phenolic compounds and antimicrobial properties of pomegranate (Punica granatum) peels.2017.
27. Verma RS, Joshi N, Padalia RC, Goswami P, Singh VR, Chauhan A. Chemical composition and allelopathic, antibacterial, antifungal and in vitro acetylcholinesterase inhibitory activities of yarrow (Achillea millefolium L.) native to India. *Indust Crop Product*. 2017;**104**:144-155. **doi:** 10.1016/j.indcrop.2017.04.046
28. Habibipour R, Moradi Haghgou L. Study on hydro-alcoholic extract effect of pomegranate peel on pseudomonas aeruginosa biofilm formation. *Avicenna J Clinic Med*. 2015;**22**(3):195-202.