مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: **www.fsct.modares.ac.ir**

مقاله علمی_پژوهشی

ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی اسانس پوست پرتقال دزفولی با و بدون آنتی‌بیوتیک‌های درمانی بر تعدادی از باکتری‌های بیماری‌زا در شرایط آزمایشگاهی

محمد نوشاد[1*]، بهروز علیزاده بهبهانی[1]، حسین جوینده[2]، مصطفی رحمتی جنیدآباد[3]، محسن ابراهیمی همتی کیخا[4]، میترا قدسی شیخ‌جان[5]

۱- استادیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران

۲- دانشیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران

۳- استادیار، گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران

٤- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران

۵- دکتری حرفه‌ای دامپزشکی، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله:

تاریخ دریافت: ۹۹ /۰۷/۰۲

تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۸/۱۱

کلمات کلیدی:

اسانس پوست پرتقال،

فعالیت ضدمیکروبی،

نگهدارنده طبیعی،

آنتی‌بیوتیک‌های رایج.

DOI: 10.52547/fsct.18.02.14

*مسئول مکاتبات:

Noshad@asnrukh.ac.ir

چکیده

با توجه به افزایش بیماری‌های عفونی ناشی از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا، شناسایی گیاهان دارویی وهمچنین خالص‌سازی ترکیبات مؤثر موجود در آن‌ها در درمان بیماری‌ها می‌تواند مفید واقع شود. در این پژوهش آزمایشگاهی، فعالیت ضدمیکروبی اسانس پوست پرتقال دزفولی بر ۳ سویه گرم منفی *(اشرشیاکلی، سودوموناس آئروژینوزا و سالمونلا تیفی)* و۵ سویه گرم مثبت *(استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس، باسیلوس سابتلیس، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و لیستریا اینوکوا)*، با استفاده از روش‌های دیسک دیفیوژن آگار،حفره در آگار، حداقل غلظت بازدارندگی رشد (میکرودایلوشن براث)، حداقل غلظت کشندگی و همچنین برهمکنش آن با آنتی‌بیوتیک‌های کلرامفنیکل،جنتامایسین، تتراسایکلیندر شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از روش دیسک دیفیوژن نشان داد بیشترین هاله عدم رشد مربوط به *باسیلوس سرئوس* با قطر ۲۱/۲۰ میلی‌متر بود. کمترین قطر هاله عدم رشد نیز مربوط به سویه*لیستریا اینوکوآ* با قطر ۱۳/۲۰ میلی‌متر بود.در آزمون حفره در آگار بیشترین قطر هاله عدم رشد مربوط به باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* با قطر ۱۷/۳۰ میلی‌متربود و کمترین قطر هاله عدم رشد مربوط به باکتری گرم منفی*اشرشیاکلی* با قطر ۱۱/۱۰ میلی‌متر بود. نتایج مربوط به حداقل غلظت بازدارندگی از رشد باکتری‌های *اشرشیاکلی، سودوموناس آئروژینوزا، سالمونلا تیفی، استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس، باسیلوس سابتلیس، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و لیستریا اینوکوا* به‌ترتیب ۲۵، ٤۰۰، ۵۰، ۱۲/۵، ۲۵، ۲۵، ٤۰۰ و ۱۲/۵میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. نتایج مربوط به حداقل غلظت کشندگی اسانس پرتقال بر تمامی سویه‌ها بزرگتر از ٤۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود.

۱- مقدمه

تعیین زمان دقیق استفاده و به‌کارگیری از گیاهان به‌عنوان دارو بسیار دشوار است. شواهد و مدارک بسیار زیادی وجود دارد که برخی از گیاهان را به منظور استفاده از ترکیبات ثانوی آن‌ها به‌عنوان دارو در حدود ٦٠ هزار سال پیش کشت می‌داده‌اند[١]. دست نوشته‌های به‌دست آمده در مورد استفاده از گیاهان دارویی درکشورهای هند، چین و مصر تقریباً به ۵۰۰۰ سال پیش باز می‌گردد[٢]. از زمان‌های بسیار قدیم، جوامع بشری به دنبال درمان بیماری‌های خود با استفاده از طبیعت بودند. همان طور که استفاده از حیوانات در ابتدا به‌صورت غریزی بود، چنین استفاده غریزی برای گیاهان نیز اعمال شد[٣]. با توجه به اینکه در آن زمان اطلاعات زیادی در مورد دلایل بیماری وجود نداشت، استفاده از گیاهان دارویی برای درمان بیماری‌ها و روش‌های استفاده از آن‌ها به صورت مرسوم وجود نداشت و همه چیز به‌صورت تجربی بود. با گذشت زمان، دلایل استفاده از برخی گیاهان دارویی برای معالجه برخی بیماری‌ها کشف شد[٤].

پرتقال با نام علمی *Citrus sinensis* از خانواده مرکبات بوده و درخت آن به ارتفاع بین ۷ تا ۱۵ متر می‌باشد. این درخت بومی کشور چین است، اما با گذشت زمان در اکثر نقاط جهان به‌خصوص مناطق استوایی و نیمه استوایی کشت داده شده است و در حال حاضر بالاترین میزان کشت را در جهان دارد. میوه این گیاه به شکل دایره‌ای یا بیضی می‌باشد و در زمانی که به صورت کال هست به رنگ سبز دیده می‌شود و با گذشت زمان و رسیدن میوه به رنگ زرد یا نارنجی نمایان می‌شود[٥ و ٦]. پوست پرتقال بخش زیادی از ضایعات این میوه را تشکیل می‌دهد اما امروزه از اسانس آن به‌عنوان یک افزودنی طعم‌دهنده در برخی از محصولات از جمله کیک به‌کار گرفته می‌شده است[٧]. نتایج آنالیز ترکیبات شیمیایی اسانس پوست پرتقال نشان می‌دهد که ترکیبات موثر موجود در آن شامل لیمونن، بتا میرسن، آلفا پینن، بتا پینن و ... می‌باشد[٨].

در این پژوهش اثر ضدمیکروبی اسانس پوست پرتقال دزفولی بر ۸ سویه میکروبی بیماری‌زا با استفاده از روش‌های متنوع کیفی و کمی شامل دیسک دیفیوژن، حفره در آگار، حداقل غلظت بازدارندگی رشد (میکرودایلوشن براث)، حداقل غلظت کشندگی و همچنین برهمکنش آن با آنتی‌بیوتیک‌های کلرامفنیکل، جنتامایسین، تتراسایکلین در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- تهیه اسانس پوست پرتقال

این پژوهش از مهرماه ۱۳۹۸ تا اسفندماه ۱۳۹۸ در آزمایشگاه میکروبیولوژی مواد غذایی،دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان انجام پذیرفت. اسانس پوست پرتقال با روش تقطیر با آب استحصال شد و در ظروف مخصوص تیره رنگ و به دور از نور درون یخچال (٤ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شد.

۲-۲- تهیه مواد شیمیایی و محیط‌های کشت میکروبی

مواد شیمیایی مورد استفاده در این پژوهش شامل: تری فنیل تترازولیوم کلراید (سیگما آلدریچ)، دیسک‌های بلانک و دیسک‌های آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل، جنتامایسین، تتراسایکلین (پادتن طب)، توئین ۸۰ (مرک آلمان) و دی متیل سولفوکساید (سیگما آلدریچ)، بودند. همچنین در این پژوهش محیط‌های کشت مولر هینتون آگار و مولر هینتون براث (مرک آلمان) مورد استفاده قرار گرفتند.

۲-۳- تهیه و آماده‌سازی سوسپانسیون‌های میکروبی

سویه‌های میکروبی مورد استفاده در این پژوهش شامل ۳ سویه گرم منفی (*اشرشیا کلی، سودوموناس آئروژینوزا و سالمونلا تیفی*) و ۵ سویه‌گرم مثبت (*استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس، باسیلوس سابتلیس، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و لیستریا اینوکوا*) بودند. سویه‌های باکتریایی از کلکسیون میکروبی آزمایشگاه میکروبیولوژی مواد غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان تهیه گردید. با توجه به اینکه سویه‌های میکروبی به‌صورت لیوفیلیزه بودند، به منظور احیاء و تکثیر آن‌ها در شرایط استریل به

محیط کشت مولر هینتون براث افزوده شدند. سپس به‌منظور تسریع در رشد آن‌ها، به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از گذشت مدت زمان مذکور به‌منظور به‌دست آوردن کشت تازه، سویه‌های میکروبی روی سطح محیط کشت مولر هینتون آگار به‌صورت خطی کشت داده شدند و مجدد در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲٤ ساعت در انکوباسیون قرار گرفتند. برای تهیه سوسپانسیون‌های باکتریایی از کشت تازه (۲٤ساعته) استفاده گردید، سوسپانسیون‌های مورد نظر در محلول سرم فیزیولوژی استریل که حاوی Colony Forming Unit (CFU)/mL $۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ سویه باکتریایی (معادل استاندارد نیم مک‌فارلند) بود تهیه شد[۹].

۲-٤- دیسک دیفیوژن (کربی- بوئر)

جهت انجام این آزمون در ابتدا ظروف استریل (پتری دیش) با میزان مشخصی از محیط کشت مولر هینتون آگار (۲۰ میلی‌لیتر) پر گردید. پس از گذشت ۳۰ دقیقه از پر کردن ظروف (به منظور سرد شدن و بسته شدن محیط کشت)، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون‌های میکروبی تهیه شده معادل استاندارد نیم مک‌فارلند روی سطح محیط‌های کشت مولر هینتون آگار ریخته شد و توسط اسپریدر ال شکل استریل پخش گردید. دیسک‌های کاغذی بلانک در فاصله معین به کمک پنس استریل بر سطح محیط کشت مولر هینتون آگار قرار داده شدند. سپس ۱۰ میکرولیتر از اسانس پوست پرتقال استریل (استریل شده با فیلتر سر سرنگی با منفذ ۰/٤۵ میکرون)، با کمک سمپلر به آرامی بر سطح دیسک‌های بلانک که قبلاً روی سطح محیط کشت مولر هینتون آگار قرار داده شده بودند، ریخته شد. پتری دیش‌های حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار و دیسک‌های حاوی اسانس پوست پرتقال به‌منظور انجام عمل پیش انتشار در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ دقیقه در یخچال نگهداری شدند. پس از انجام عمل پیش انتشار محیط‌های کشت به درون انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲٤ ساعت منتقل گردید. پس از سپری شدن ۲٤ ساعت محیط کشت‌ها از انکوباسیون خارج و قطر هاله‌های عدم رشد آن‌ها توسط خط‌کش اندازه‌گیری گردید و بر حسب میلی‌متر گزارش گردید[۹ و ۱۰].

۲-۵- حفره در آگار

برای انجام این آزمون در ابتدا با استفاده از پیپت پاستور استریل میزان مشخصی از محیط کشت مذاب مولر هینتون آگار (۲۰ میلی‌لیتر)، به درون هر کدام از ظروف (پتری دیش) ریخته شد. پس از بسته شدن محیط‌های کشت در درون ظروف حفره-هایی با قطرهای یکسان (٦ میلی‌متر) در سطح آن ایجاد گردید. سپس یک قطره محیط کشت مولر هینتون آگار مذاب در درون چاهک‌ها به منظور ممانعت از نفوذ اسانس‌پوست پرتقال به کف ظروف (پتری دیش) ریخته شد. میزان ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون‌های باکتریایی معادل استاندارد نیم مک‌فارلند به گونه‌ای که درون چاهک‌ها نفوذ نکند روی سطح محیط کشت مولر هینتون آگار ریخته و و به کمک میله ال شکل پخش گردید. در نهایت میزان ۲۰ میکرولیتر از اسانسپوست پرتقال استریل به درون تمام چاهک‌ها به جزء حفره شاهدافزوده شد و ظروف (پتری دیش) به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به درون انکوباسیون منتقل گردید. پس از اتمام مدت زمان انکوباسیون قطر هاله‌های عدم رشد اطراف چاهک‌ها با کمک خط‌کش اندازه‌گیری شدند و نتایج آن بر حسب میلی‌متر ثبت گردید[۱۱].

۲-٦- حداقل غلظت بازدارندگی از رشد (میکرودایلوشن براث)

آزمون حداقل غلظت بازدارندگی از رشد اسانس پوست پرتقال در چاهک‌های ۹٦ خانه‌ای استریل و به روش میکرودایلوشن براث انجام پذیرفت. این میکروپلیت‌ها در ۱۲ ستون ۸ چاهکی و به حجم ۲۵۰ میکرولیتر و به صورت استریل وجود دارند. در ابتدا از اسانس پرتقال غلظت ٤۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر محلول مادر تهیه گردید. برای این منظور ٤ گرم از اسانس پرتقال با ۹/۵ میلی‌لیتر محیط کشت مولر هینتون براث اضافه گردید، به منظور مخلوط شدن اسانس و محیط کشت نیم میلی‌لیتر دی متیل سولفوکساید به آن‌ها اضافه شد و سپس مخلوط مورد نظر به‌منظور اختلاط بیشتر شیک داده شد. از استوک تهیه شده رقت‌های متوالی که شامل غلظت‌های ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ٦/۲۵، ۳/۱۲۵، ۱/۵٦ و ۰/۷۸ بودند، تهیه شدند. از رقت‌های تهیه شده میزان ۱۰۰ میکرولیتر به صورت ستونی به چاهک‌ها اضافه

گردید. دو ستون آخر یعنی ستون‌های ۱۱ و ۱۲ به عنوان چاهک‌های کنترل مثبت و منفی در نظر گرفته شدند. سپس به هر یک از چاهک‌ها میزان ۲۰ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی معادل استاندارد نیم مک‌فارلند اضافه گردید. پس از طی زمان گرمخانه‌گذاری به‌مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به هر یک از چاهک‌ها میزان ۲۰ میکرولیتر معرف تری فنیل تترازولیوم کلرایداستریل اضافه شد. در نهایت میکروپلیت ۹٦ خانه‌ای مجدد به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در گرمخانه قرار داده شد. پس از اتمام زمان مذکور کمترین غلظتی از اسانس پرتقال که رنگ قرمز یا ارغوانیمشاهده نشد به‌عنوان حداقل غلظت بازدارندگی از رشد اسانس پوست پرتقال در نظر گرفته شد[۱۲ و ۱۳].

۲-۷- حداقل غلظت کشندگی

تعیین حداقل غلظت کشندگی اسانس پوست پرتقال بر اساس نتایج حداقل غلظت بازدارندگی از رشد محاسبه گردید. برای این منظور از چاهک‌هایی که در آن هیچ گونه تغییر رنگی بعد از اضافه کردن معرف تری فنیل تترازولیوم کلراید دیده نشد، میزان ۱۰۰ میکرولیتر برداشته و به‌صورت جداگانه بر سطح محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد. سپس محیط‌های مذکور به انکوباتور منتقل شده و به مدت ۲٤ ساعت و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. در نهایت کمترین غلظتی از اسانس که در آن هیچ کلنی مشاهده نشد، به عنوان حداقل غلظت کشندگی اسانس پوست پرتقال در نظر گرفته شد[۱۱ و ۱۲].

۲-۸- ارزیابی هم‌افزایی و کاهندگی اسانس پوست پرتقال درترکیب با آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین، تتراسایکلین و کلرامفنیکل

برای ارزیابی اثر ترکیبی اسانس پرتقال با آنتی بیوتیک‌های جنتامایسین، تتراسایکلین و کلرامفنیکل مطابق با روش برزگر و همکاران (۱۳۹۸)، استفاده گردید. برای بررسی اثر هم‌افزایی و کاهندگی اسانس بر آنتی‌بیوتیک‌های مذکور از غلظت تحت مهاری (sub-MIC) استفاده شد. در این پژوهش با توجه به فرمول غلظت تحت مهاری، غلظت ۱/۲ اسانس پوست پرتقال به محیط کشت مذاب مولر هینتون آگار اضافه گردید. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی (معادل استاندارد نیم‌مک‌فارلند)، بر سطح محیط کشت حاوی غلظت‌های تحت مهاری اسانس پوست پرتقال توسط سمپلر ریخته شد و به کمک میله ال شکل پخش گردید. در نهایت دیسک‌های آنتی‌بیوتیک جنتامایسین، تتراسایکلین و کلرامفنیکل به صورت جداگانه بر سطح محیط‌های کشت مولر هینتون آگار قرار داده شد. محیط‌های کشت مذکور برای انجام عمل گرمخانه‌گذاری به‌مدت ۲٤ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به انکوباتور منتقل گردید. پس از گذشت مدت زمان ذکر شده قطر هاله بازدارندگی رشد با استفاده از خط کش اندازه‌گیری و به‌صورت میلی‌متر گزارش گردید[۱٤].

۲-۹- آنالیز آماری

برای تجزیه و تحلیل داده‌های این پژوهش از نرم افزار آماری SPSS[1] نسخه ۲۲ استفاده گردید، از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) جهت مقایسه میانگین‌ها و از آزمون Duncan جهت بررسی اختلاف بین میانگین‌ها در سطح $p< 0/05$ استفاده شد.

۳- نتایج و بحث

نتایج ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی اسانس پوست پرتقال به روشدیسک دیفیوژن به همراه نتایج هم‌افزایی و کاهندگی اسانس پوست پرتقال در ترکیب با آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین، تتراسایکلین و کلرامفنیکل روی سویه‌های مورد بررسی (*اشرشیاکلی، سودوموناس آئروژینوزا، سالمونلا تیفی، استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس، باسیلوس سابتلیس، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* و *لیستریا اینوکوا*) در جدول ۱، آورده شده است. نتایج حاصل از آزمون دیسک دیفیوژن نشان می‌دهد که قطر هاله عدم رشد اسانس پرتقال برای باکتری‌های *اشرشیاکلی، سودوموناس آئروژینوزا، سالمونلا تیفی، استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس، باسیلوس سابتلیس، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* و *لیستریا اینوکوا*به‌ترتیب برابر است با ۱۵/۳۰، ۱٤، ۱۵/۱۰، ۱۷/۱۰، ۲۱/۲۰، ۱۹/۳۰، ۱٦/۸۰ و ۱۳/۲۰می‌باشد. در این آزمون بیشترین قطر هاله عدم رشد مربوط

1. Statistical package for the social sciences

به سویه گرم مثبت *باسیلوس سرئوس* با اندازه ۲۱/۲۰ میلی‌متربود و کمترین قطر هاله عدم رشد نیز مربوط به سویه گرم منفی *لیستریا اینوکوآ*با اندازه ۱۳/۲۰ میلی‌متر بود. نتایج حاصل از این آزمون نشان داد که اسانس پرتقال دارای اثر ضدباکتریایی قابل توجهی روی سویه‌های مورد مطالعه داشت. نتایج نشان داد در حالت ترکیب اسانس پوست پرتقال با آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل برسویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا، اشرشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سابتلیس* حالت آنتاگونیسمی مشاهده گردید، اما در در حالت ترکیبی اسانس و آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل برای باکتری‌های *لیستریا اینوکوا، سالمونلا تیفی استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و باسیلوس سرئوس* حالت سینرژیستی مشاهده شد. نتایج نشان داد که در حالت ترکیبی اسانس پوست پرتقال و آنتی‌بیوتیک جنتامایسین برای باکتری‌های *سودوموناس آئروژینوز، اشرشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس* و *باسیلوس سابتلیس* حالت سینرژیستی مشاهده گردید. در حالت ترکیب اسانس و آنتی‌بیوتیک جنتامایسین نیز برای باکتری‌های *سالمونلا تیفی، لیستریا اینوکوا* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* حالت آنتاگونیسمی مشاهده گردید. نتایج نشان داد که در حالت ترکیبی اسانس پوست پرتقال و آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین بر تمامی سویه‌های مورد پژوهش به‌جزء باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* حالت آنتاگونیسمی مشاهده گردید. در حالت ترکیبی اسانس و آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین برای باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* حالت سینرژیستی مشاهده شد. در شکل ۱، نمونه‌ای از تاثیر همزمان اثر اسانس پرتقال با آنتی‌بیوتیک جنتامایسین بر باکتری *باسیلوس سابتلیس*نشان داده شده است.

Table 1 The mean inhibition zone diameter (mm) orange essential oil(OEO)and its interaction with chloramphenicol, gentamicinand tetracycline antibiotics on some pathogenic microorganisms (disk diffusion agar)

Microorganism	OEO	Chl	Gen	Tet	In (Chl + OEO)	In (Gen +OEO)	In (Tet + OEO)
P. aeruginosa	14.00 ±0.30^{e}	20.10 ±0.26^{c}	16.10 ±0.45^{f}	21.60 ±0.36^{d}	13.20 ±0.43^{d} (Ant)	22.10 ±0.17^{d}(Syn)	12.10 ±0.17^{d} (Ant)
E. coli	15.30 ±0.10^{d}	26.30 ±0.26^{a}	24.20 ±0.26^{c}	18.30 ±0.39^{e}	14.10 ±0.45^{d}(Ant)	27.20 ±0.26^{b}(Syn)	10.10 ±0.36^{e} (Ant)
S. typhi	15.10 ±0.26^{d}	17.30 ±0.51^{d}	24.26 ±0.25^{c}	18.10 ±0.10^{e}	24.10 ±0.10^{a} (Syn)	14.00 ±0.30^{e}(Ant)	8.00 ±0.20^{f}(Ant)
L. innocua	13.20 ±0.20^{f}	8.10 ±0.36^{e}	26.10 ±0.17^{b}	20.30 ±0.30^{d}	16.20 ±0.20^{c}(Syn)	12.20 ±0.20^{f}(Ant)	12.30 ±0.26^{d}(Ant)
S. aureus	17.10 ±0.36^{c}	24.10 ±0.10^{b}	22.30 ±0.26^{d}	24.30 ±0.36^{b}	16.80 ±0.17^{c} (Ant)	24.20 ±0.18^{c}(Syn)	25.30 ±0.43^{a} (Syn)
B. cereus	21.20 ±0.20^{a}	24.20 ±0.26^{b}	20.30 ±0.30^{e}	18.30 ±0.26^{f}	24.90 ±0.30^{a} (Syn)	24.30 ±0.39^{c}(Syn)	16.10 ±0.17^{b} (Ant)
B. subtilis	19.30 ±0.30^{b}	26.10 ±0.17^{a}	28.00 ±0.20^{a}	30.10 ±0.17^{a}	18.50 ±0.30^{b}(Ant)	34.30 ±0.27^{a} (Syn)	14.10 ±0.17^{c} (Ant)
S. epidermidis	16.80 ±0.36^{c}	24.00 ±0.30^{b}	26.10 ±0.26^{b}	22.10 ±0.10^{c}	25.30 ±0.36^{a} (Syn)	15.10 ±0.10^{e}(Ant)	14.00 ±0.22^{c} (Ant)

-Values are expressed as mean ±standard deviations, n = 3; different letters (a, b, c, d, e. and f) in each column show significant difference at $P \leq 0.05$.

-OEO:orange essential oil, Chl: Chloramphenicol, Gen: Gentamicin, Tet:Tetracycline, Syn: Synergy, Ant: Antagonism.

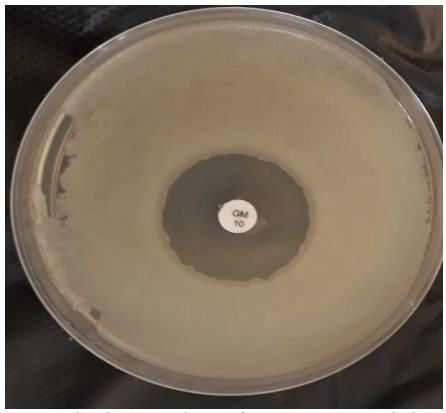

Fig 1 The interaction of orange essential oil(OEO)with gentamicin antibiotic on *Bacillus cereus*.

نتایج مربوط به فعالیت ضدمیکروبی اسانس پوست پرتقال به روش حفره در آگار، حداقل غلظت بازدارندگی از رشد و حداقل غلظت کشندگی بر سویه‌های مورد بررسیدر جدول ۲، آورده شده است. در آزمون حفره در آگار بیشترین هاله عدم رشد مربوط به باکتری گرم مثبت*استافیلوکوکوس اورئوس*با قطر ۱۷/۳۰ میلی-متربود. کمترین هاله عدم رشد مربوط به باکتری گرم منفی*اشرشیاکلی*باقطر ۱۱/۱۰ میلی‌متربود. نتایج مربوط به حداقل غلظت بازدارندگی از رشد باکتری‌های *اشرشیاکلی، سودوموناس آئروژینوزا، سالمونلا تیفی، استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس، باسیلوس سابتلیس، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*و

لیستریا اینوکوا به ترتیب برابربا ۲۵، ٤۰۰، ۵۰، ۱۲/۵، ۲۵، ۲۵، ٤۰۰ و ۱۲/۵میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. مقاوم‌ترین سویه در این آزمون مربوط به باکتری‌های گرم منفی*سودوموناس آئروژینوزا* و گرم مثبت *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس بود*. کمترین مقاومت نیز مربوط به سویه‌های*استافیلوکوکوس اورئوس ولیستریا اینوکوا* بود.نتایج مربوط به حداقل غلظت کشندگی اسانس پوست پرتقال بر تمامی سویه‌ها بزرگتر از ٤۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. به‌طور کلی حداقل غلظت کشندگی از رشد اسانس پوست پرتقال بیشتر از حداقل غلظت بازدارندگی رشد بود. شکل ۲، نمایی از حداقل غلظت بازدارندگی از رشد اسانس پوست پرتقال بر سویه‌های مورد بررسی را نشان می‌دهد.

Table 2 The well diffusion agar (WDA), minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of the orange essential oil(OEO)on some pathogenic microorganisms

Microorganism	WDA (mm)	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)
P. aeruginosa	13.00 ±0.20	400	>400
E. coli	11.10 ±0.10	25	>400
S. typhi	15.60 ±0.45	50	>400
L. innocua	12.20 ±0.20	12.5	>400
S. aureus	17.30 ±0.30	12.5	>400
B. cereus	15.30 ±0.51	25	>400
B. subtilis	12.20 ±0.26	25	>400
S. epidermidis	16.10 ±0.17	400	>400

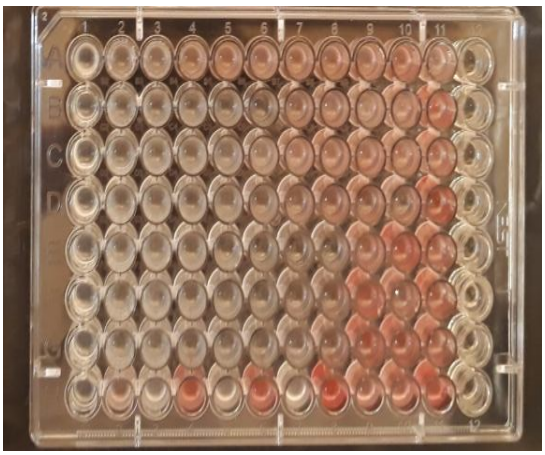

Fig 2 The minimum inhibitory concentration (MIC) of orange essential oil(OEO).

در چند دهه گذشته، پژوهش‌های فراوانی برای بررسی فعالیت ضدباکتریایی انواع ترکیبات حاصل از گیاهان از جمله اسانس‌ها و عصاره‌ها صورت پذیرفته است که حاکی از میزان توانایی و قدرت این مواد در جلوگیری از رشد طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا می‌باشد. با توجه به اینکه این ترکیبات کاملاً به‌صورت طبیعی وجود دارند، بنابراین تاثیرات منفی و زیان‌آور آن‌ها بر سلامتی انسان‌ها و محیط زیست بسیار کمتر از آنتی‌بیوتیک‌های شیمیایی می‌باشد. در این پژوهش اثر ضدمیکروبی اسانس پوست پرتقال بر ۸ سویه باکتری بیماری‌زا مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که اسانس پرتقال به خوبی می‌تواند مانع از رشد باکتری‌های مورد مطالعه گردید. Parish و همکاران (۲۰۰۳)، در پژوهشی اثر ضدمیکروبی اسانس پرتقال را روی تعدادی از سویه‌های باکتریایی مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل از پژهش آن‌ها نشان داد که اسانس پرتقال روی باکتری‌های مورد مطالعه به‌خصوص باکتری سالمونلا اثر ضدمیکروبی قابل توجهی دارد[۱۵].O'bryan و همکاران (۲۰۰۸)، فعالیت ضدمیکروبی اسانس پرتقال را روی ۱۱سروتیپ سالمونلا مورد مطالعه قرار دادند. نتایج حاصل از مطالعه آن‌ها نشان داد که اسانس پرتقال روی ۱۱ سروتیپ سالمونلا دارای فعالیت ضدمیکروبی بود [۱٦].Neng-guo و همکاران (۲۰۰۹)، ترکیب شیمیایی و فعالیت ضدمیکروبی اسانس پوست پرتقال شیرین (بن گتانگ) را مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل از پژوهش آن‌ها نشان داد که اسانس پرتقال دارای طیف گسترده‌ای از فعالیت ضدمیکروبی بر گونه‌های مورد مطالعه آن‌ها (*استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیا کلی، باسیلوس سابتلیس، ساکارومایسس سرویزیه و پنی سیلیوم کریزوژنوم*) بود[۱۷]. Celikelو همکاران (۲۰۰۸)، در طی پژوهشی اسانس‌های آویشن، مورد سبز، برگ بو، مریم گلی و پرتقال را مختلف روی سویه‌های باکتریایی*لیستریامنوسیتوژنز* و

استافیلوکوکوس اورئوس و مخمر *کاندیدا آلبیکانس* مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل از پژوهش آن‌ها نشان داد که این اسانس‌های مورد مطالعه دارای خاصیت ضدباکتریایی قوی هستند[۱۸]. مقایسه پژوهش‌های گذشته با مطالعه حاضر مشابه بود. در پژوهش ما نیز اسانس پوست پرتقال اثر ضدمیکروبی بر تمامی سویه‌های میکروبی داشت، هر چند اختلاف‌هایی در میزان فعالیت ضدمیکروبی مشاهده شد.

٤- نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد، که اسانس پوست پرتقال در شرایط آزمایشگاهی اثر ضدمیکروبی قابل توجهی بر سویه‌های مورد مطالعه داشت. به‌طور کلی با توجه به ماهیت طبیعی اسانس پرتقال می‌توان از آن به‌عنوان یک ترکیب ضدباکتریایی طبیعی علیه میکروارگانیسم‌های عامل عفونت و مسمومیت غذایی استفاده کرد. در ادامه پژوهش‌هایی در راستای استفاده از این اسانس در مواد غذایی پیشنهاد می‌گردد.

٥- تشکروقدردانی

مقاله حاضر مستخرج از طرح پژوهشی کاربردی کلانبا کد ۱/٤۱۱/٤۸٥ می‌باشد که توسط معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان حمایت گردیده است، لذا نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند از حمایت‌های مادی و معنوی به عمل آمده صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند.

٦- منابع

[1] Solecki R, Shanidar I.V. a Neanderthal flower burial in Northern Iraq. Science. 1975; 190(4217):880-1.

[2] Ang-Lee M.K, Moss J, Yuan CS. Herbal medicines and perioperative care. Journal of the American Medical Association. 2001;286(2):208-16.

[3] Stojanoski N. Development of health culture in Veles and its region from the past to the end of the 20th century. Veles: Society of science and art. 1999:13-34.

[4] Qiu J. Traditional medicine: a culture in the balance. Nature. 2007;448(7150):126-8.

[5] Ehler, S.A. Citrus and its benefits, Journal of Botany, 2011; 5: 201- 207.

[6] Nicolosi, E., Deng, Z. N., Gentile, A., La Malfa, S., Continella, G. Tribulato, E. Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers, Theoretical and Applied Genetics, 2000; 100(8):1155-1166.

[7] Nakhaiee Moghadam, M. Antimicrobial in vitro effects of methanolextract of orange peel (Citrus sinensis)against clinical isolates of Helicobacterpylori. Journal of Biological and MicrobialTechnology, Islamic Azad University, 2009;1(5):37-43 [in Persian].

[8] Dehghan, B., Esmaeilzadeh Kenari, R., Raftani Amiri, Z. Comparison of chemical composition and antioxidant activity of essential oils of orange peel in two ways supercritical fluid extraction and hydro distillation. Food Science and Technology. 2018;15(77):335-25.

[9] Sureshjani, M. H., Yazdi, F. T., Mortazavi, S. A., Behbahani, B. A., & Shahidi, F. Antimicrobial effects of Kelussia odoratissima extracts against food borne and food spoilage bacteria" in vitro. *Journal of Paramedical Sciences,* 2014; 5(2), 115-120.

[10] Jones, R.N, Ballow, C.H, Biedenbach, D.J.Multi-laboratory assessment of the linezolidspectrum of activity using the Kirby-Bauerdisk diffusion method: Report of the ZyvoxAntimicrobial Potency Study (ZAPS) in theUnited States. Diagnostic Microbiology andInfectious Disease. 2001; 40(1):59-66.

[11] Alizadeh Behbahani, B., & Imani Fooladi, A. A. Development of a novel edible coating made by Balangu seed mucilage and Feverfew essential oil and investigation of its effect on the shelf life of beef slices during refrigerated storage through intelligent modeling. *Journal of Food Safety,* 2018, 38(3), e12443.

[12] Alizadeh Behbahani B, Imani Fooladi AA. Evaluation of phytochemical analysis and antimicrobial activities Allium essential oil against the growth of some microbial pathogens. Microbial Pathogenesis. 2018; 114:299-303.

[13] Celiktas, O.Y, Kocabas E.E.H, Bedir, E, Sukan F.V, Ozek, T, Baser K.H.C. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of Rosmarinus officinalis, depending on location and seasonal variations. Food Chemistry. 2007; 100(2): 553-9.
[14] Barzegar, H. Alizadeh Behbahani, B., Mehrnia, M. A. Identification of the chemical compounds andantibacterial activity of Ocimumbasilicumessential oil and the effects of its interactionwith tetracycline and chloramphenicol antibiotics on some pathogenic microorganisms causing infection and food poisoning. Journal of Food Science and Technology. 2019;90(16): 113-125.
[15] Parish, M. E, Baum, D, Kryger, R, Goodrich, R. M, Baum, R, Fate of salmonellae in citrus oils and aqueous aroma. Journal of Food Protection.2003;66(9):1704- 1707.
[16] O'bryan, C.A, Crandall, P.G, Chalova V.I, Ricke S.C. Orange essential oils antimicrobial activities against Salmonella SPP. Journal of food Science. 2008; 73(6): 264-267.
[17] Neng-guo Tao, Yue-jin Liu,. Miao-ling Zhang. Chemical composition and antimicrobial activities of essential oil from the peel of bingtang sweet orange (Citrus sinensis Osbeck). International Journal of Food Science and Technology,2009; 44:1281–1285.
[18] Celikel, N., Kavas, G. Anti microbial propertice of some essential oil against somepathogenic microorganisms. Czech Journal of Food Science, 2008; 261: 174-181.

Iranian Journal of Food Science and Technology

Homepage: www.fsct.modares.ir

Scientific Research

In vitro investigation of the antimicrobial activity of Dezfuli orange peel essential oil with and without common antibiotics on some pathogenic bacteria

Noshad, M. [1]*, Alizadeh Behbahani, B. [1], Jooyandeh, H. [2], Rahmati-Joneidabad, M. [3], Ebrahimi Hemmati Kaykha, M. [4], Ghodsi Sheikhjan, M. [5]

1. Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran.
2. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran.
3. Assistant Professor, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran.
4. MSc. student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran.
5. DVM, Department of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran.

ABSTRACT

Given the rise in the infectious diseases caused by pathogens, identification of medicinal plants and purification of their nutraceuticals can be useful in treating such diseases. In this experimental study, the antimicrobial activity of Dezfuli orange peel essential oil was examined on 3 Gram-negative strains (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonellatyphi*) and 5 Gram-positive strains (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis* and *Listeriainnocua*) through agar disc diffusion, agar well diffusion, minimum inhibitory concentration (microdilution broth) and minimum bactericidal concentration. Furthermore, the interactions between the essential oil and chloramphenicol, gentamycin and tetracycline were investigated. The results of disc diffusion showed that the longest and shortest diameters of the growth inhibition zone belonged to *B. cereus* (21.20 mm) and *L. innocua* (13.20 mm) respectively. In the agar diffusion test, *S. aureus* and *E. coli* respectively had the longest (17.30 mm) and shortest (11.10 mm) diameters of the inhibition zone. The minimum inhibitory concentration was equal to 25, 400, 50, 12.5, 25, 25, 400 and 12.5 mg/ml for *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. typhi*, *S. aureus*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. epidermidis* and *L. innocua* respectively. The minimum bactericidal concentration of the essential oil was greater than 400 mg/ml for all the strains.

ARTICIE INFO

Article History:

Received 23 September 2020
Accepted 01 November 2020

Keywords:

Orange peel essential oil;
Antimicrobial activity;
Natural preservative;
Common antibiotics

DOI: 10.52547/fsct.18.02.14

*Corresponding Author E-Mail:
Noshad@asnrukh.ac.ir