



مقاله علمی-پژوهشی

ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی و اثر ضد میکروبی روغن سیاه دانه بر برخی از باکتری های بیماری زا و برهمکنش آن با آنتی بیوتیک کلرامفنیکل

علی زمانپور بروجنی^۱، بهروز عزیزاده بهبهانی^{۲*}، محمدامین مهرنیا^۲، محمد نوشاد^۲، محمد حجتی^۳

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

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

۳- استاد، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاتانی، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۶/۴

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۷/۲۷

کلمات کلیدی:

روغن سیاه دانه،

اثر ضد میکروبی،

فعالیت آنتی اکسیدانی،

ترکیبات فنلی.

امروزه با افزایش بیماری ها و تمایل مصرف کنندگان به استفاده از غذاهای ارگانیک، استفاده از ترکیبات طبیعی گیاهی برای بهبود و افزایش عمر ماندگاری آنها رو به افزایش است. علاوه بر این، استفاده از گیاهان دارویی که دارای خاصیت درمانی نیز هستند، مورد توجه قرار گرفته است. روغن سیاه دانه به دلیل خواص درمانی، از گذشته توجه زیادی را به خود معطوف داشته است. هدف از این پژوهش، بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی و ارزیابی فعالیت ضد میکروبی روغن سیاه دانه بر باکتری های /شرشیا کلی، سودوموناس اثرورژینوزا، سالمونلا تیفی، استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا مونوسیژنوز و باسیلوس سرئوس بود. میزان ترکیبات فنولی روغن سیاه دانه با معرف معرف فولین - سیو کالتو اندازه گیری شد. فعالیت آنتی اکسیدانی روغن سیاه دانه توسط روش های مهار رادیکال DPPH و ABTS تعیین گردید. اثر ضد میکروبی روغن سیاه دانه، مطابق روش های ضد میکروبی چاهک آگار، دیسک دیفیوژن آگار، برهمکنش، حداقل غلظت مهار کنندگی و حداقل غلظت کشندگی بررسی شد. روغن سیاه دانه دارای مقدار ترکیبات فنولی ۱۶/۲۵ mg GAE/g بود. فعالیت آنتی اکسیدانی بر حسب مهار رادیکال DPPH و ABTS به ترتیب ۸۶/۶۲ و ۹۴/۸۵ درصد بود. روغن سیاه دانه، اثر ضد میکروبی قابل توجهی بر میکروارگانیسم های مورد بررسی از خود نشان داد. نتایج برهمکنش روغن سیاه دانه با آنتی بیوتیک کلرامفنیکل نشان داد که برای تمامی باکتری های بیماری زا اثر سینرژیستی مشاهده شد. با توجه به فعالیت آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی قابل توجه روغن سیاه دانه، می توان از این روغن در صنایع غذایی و دارویی استفاده کرد.

DOI: 10.22034/FSCT.20.145. 111

* مسئول مکاتبات:

B.alizadeh@asnruk.ac.ir

۱- مقدمه

کتب تاریخی در زمینه پزشکی حاوی اطلاعات گسترده و فراوانی در زمینه استفاده از گیاهان دارویی در درمان بیماری ها هستند، به ویژه کتبی که مربوط به کشورهای دارای تمدن دیرینه همچون ایران هستند. از اطلاعات ارزشمند ایرانیان می توان به زمینه های مطالعه آن ها در طب سنتی، شناخت گیاهان دارویی و کاربرد درمانی آن ها حتی پیش از دیگران اشاره کرد [۱]. پیشرفت های علمی و فناوری طی دهه های اخیر اهمیت و نقش سازنده گیاهان دارویی را به ویژه در تامین نیاز های دارویی و درمانی بشر بیش از پیش ساخته است [۲]. روغن، یکی از اشکال دارویی است که به شکل مایع یا نیمه جامد وجود دارد. روغن های گیاهی، محلولی حاوی تمامی مواد مفید موجود در گیاه یا قسمتی که روغن از آن استخراج شده است نظیر فلاونوئیدها، تانن ها، املاح و یا سایر ترکیباتی که فعالیت ضدباکتریایی و آنتی اکسیدانی داشته و مانع انجام واکنش های ناخواسته در محیط های غذایی می شوند. آنتی اکسیدان های مختلفی در پلاسما، خون انسان وجود دارد ولی این آنتی اکسیدان ها به تنهایی قادر به مبارزه با رادیکال های آزاد تولید شده در بدن نیستند لذا لازم است این کمبود با مصرف منابع خارجی از طریق غذا تامین شود. آنتی اکسیدان ها علاوه بر کاهش احتمال سکتة و بیماری های قلبی - عروقی در پیشگیری از سرطان نیز نقش دارند [۳-۹].

سیاه دانه یا «سُنیز» با نام علمی *Nigella sativa* گیاهی یک ساله، گلدار و بومی اروپای شرقی و کشورهای بلغارستان، قبرس، رومانی، غرب آسیا و کشورهای ایران، ترکیه و عراق است اما امروزه در مناطق دیگری از اروپا و آسیا نیز می روید. این گیاه از خانواده آلاله ها و شماره گلبرگ های آن از پنج تا هشت است و دانه های سیاه رنگ آن در برگه های وسط گل قرار گرفته و بوی مخصوصی دارد. این گیاه حدود ۲۰ تا ۳۰ سانتی متر رشد می کند و دارای میوه ای سه قسمتی، بزرگ و کپسول مانند است که حاوی تعداد زیادی بذر است. این بذرها

سیاه، به عنوان ادویه یا یک افزودنی در صنایع غذایی از جمله در آشپزی و قنادی، مورد استفاده هستند [۱۰ و ۱۱].

یامیر و همکاران (۲۰۱۹)، ارزیابی محتوای پلی فنولی و توکوفرولی روغن سیاه دانه را مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهشگران نشان داد که سیاه دانه سرشار از پلی فنول ها و توکوفرول هاست و روغن آن شامل اسیدهای لینولئیک، اولئیک، پالمیتیک و استئاریک می باشد [۱۲]. در مطالعه های نیکاور و همکاران (۲۰۰۳) [۱۳] و رامدان و مورسل (۲۰۰۲) [۱۴] ترکیبات دانه سیاه دانه مورد بررسی قرار گرفت. در طی این پژوهش ها، مشخص شد که دانه های سیاه دانه حاوی ویتامین، مواد معدنی، پروتئین و کربوهیدرات، فسفولپیدها، کاروتن، کلسیم، آهن و پتاسیم می باشد. هدف از پژوهش حاضر ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی و اثر ضد میکروبی و برهمکنش روغن سیاه دانه در شرایط آزمایشگاهی بود.

۲- مواد و روش ها

روغن سیاه دانه از شرکت محصولات گیاهی باران تهیه شد. کلیه مواد شیمیایی و حلال های مورد استفاده در این پژوهش، از شرکت مرک آلمان با درجه خلوص آزمایشگاهی خریداری شد.

۲-۱- آماده سازی نمونه روغن سیاه دانه

در این پژوهش، برای اندازه گیری ترکیبات فنولی روغن سیاه دانه از روش عباسی و همکاران (۱۳۹۰)، استفاده شد. ۱ گرم از نمونه روغن با ۲ میلی لیتر متانول ۹۰ درصد مخلوط شده و بعد از مدت زمان ۴ دقیقه و رتکس، نمونه ها در سانتریفیوژ با دور ۳۰۰۰g به مدت ۵ دقیقه قرار داده شد [۱۵]. سپس از محلول رویی به منظور اندازه گیری میزان ترکیبات فنولی کل و آزمون مهار رادیکال آزاد DPPH^۱ و ABTS^۲ استفاده شد.

۲-۲- اندازه گیری محتوای فنولی

به منظور اندازه گیری محتوای فنولی کل از معرف فولین - سیو کالتو بر اساس روش مهرنیا و همکاران (۲۰۲۱)، استفاده شد. در این روش

1- 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
2- 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)

طبیعی خوزستان که شامل ۳ باکتری گرم منفی (*اشرشیا کلی*^۱، *سودوموناس ائروژینوزا*^۲ و *سالمونلا تیفی*^۳) و ۳ باکتری گرم مثبت (*استافیلوکوکوس اورئوس*^۴، *لیستریا مونوسیژنوز*^۵ و *باسیلوس سرئوس*^۶) استفاده شد. برای تهیه سوسپانسیون میکروبی جهت ارزیابی فعالیت ضد میکروبی روغن سیاه دانه، مطابق استاندارد نیم مک فارلند اقدام شد و در نهایت سوسپانسیون میکروبی حاوی 1×10^8 CFU/mL تهیه گردید [۱۹].

۲-۶- دیسک دیفیوژن آگار

در آزمون دیسک، پس از آماده سازی محیط کشت مولر هیتون آگار، به کمک سمپلر سوسپانسیون میکروبی تهیه شده از کشت تازه سویه های میکروبی بیماری زا مطابق استاندارد نیم مک فارلند در سطح محیط کشت پخش شد و سپس با کمک پنس، ۳ دیسک غوطه ور شده در روغن سیاه دانه روی پلیت قرار گرفت و یک دیسک که حاوی آب مقطر است به عنوان شاهد در هر پلیت قرار داده شد. پتری دیش ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوباتور گذاری شدند. پس از پایان زمان انکوباسیون، ناحیه بازدارندگی یا عدم رشد در اطراف هر یک از دیسک ها به طور دقیق با خط کش اندازه گیری و بر حسب میلی متر یادداشت شد [۲۰، ۲۱].

۲-۷- چاهک آگار

در آزمون چاهک، پس از آماده سازی محیط کشت مولر هیتون آگار، به کمک پی پت پاستور استریل، ۴ عدد چاهک به قطر ۶ میلی متر در سطح پتری دیش ایجاد شد. با کمک سمپلر ۲۰ میکرو لیتر سوسپانسیون میکروبی تهیه شده از کشت تازه سویه های میکروبی بیماری زا با غلظت نیم مک فارلند درون ۳ چاهک ریخته شد و چاهک چهارم به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. سپس پتری دیش ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوباتور گذاری شدند. پس از پایان زمان انکوباسیون، ناحیه بازدارندگی یا عدم رشد در اطراف هر یک از دیسک ها به طور دقیق با خط کش اندازه گیری و بر حسب میلی متر یادداشت شد [۲۲، ۲۳].

۲/۵ میلی لیتر محلول فنول با ۱ میلی لیتر از عصاره نمونه مخلوط و بعد از گذشت ۶ دقیقه ۲/۵ میلی لیتر کربنات سدیم ۷ درصد اضافه شده و بعد از مدت زمان یک ساعت به دستگاه اسپکتوفتومتر انتقال و در طول موج ۷۲۵ نانومتر اعداد مورد نظر ثبت گردید. مقدار فنل کل بر حسب mg GAE/g گزارش شد [۱۶].

۲-۳- تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی به روش DPPH

جهت تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی روغن سیاه دانه با روش نوشاد و همکاران (۲۰۲۲)، ۱ میلی لیتر از عصاره نمونه با ۲/۹ میلی لیتر از DPPH ۰/۱ میلی مولار در متانول به صورت جداگانه مخلوط شده و به مدت ۳۰ دقیقه در مکان تاریک در دمای اتاق نگهداری شد. سپس در طول موج ۵۱۵ نانومتر عدد جذب آن بررسی شد. نمونه متانول خالص نیز به عنوان نمونه شاهد مورد استفاده قرار گرفت. درصد فعالیت مهار کنندگی با استفاده از معادله زیر محاسبه شد [۱۷].

$$\text{درصد جذب} = \frac{(\text{جذب روغن} - \text{جذب نمونه شاهد})}{\text{جذب نمونه شاهد}} \times 100$$

رادیکال DPPH

۲-۴- تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی به روش ABTS

به منظور تعیین ظرفیت مهار کنندگی رادیکال آزاد ABTS، از روش سوسنی غریبوند و همکاران (۱۳۹۹)، استفاده شد [۱۸]. برای اندازه گیری فعالیت آنتی اکسیدانی با رادیکال های آزاد ABTS ابتدا رادیکال ABTS^+ تهیه گردید. محلول آبی از ABTS به غلظت ۷ میلی مولار تهیه و به این محلول، پتاسیم پرسولفات اضافه شد تا غلظت نهایی آن به ۲/۴۵ میلی مولار در محلول برسد. محلول حاصل در شرایط دمای اتاق و تاریکی به مدت ۱۶ ساعت قرار داده شد. سپس ۳۰۰ میکرو لیتر از نمونه عصاره به ۳ میلی لیتر از محلول رادیکال ABTS اضافه شد و پس از گذشت ۶ دقیقه به دستگاه اسپکتوفتومتر انتقال و در طول موج ۷۳۴ نانومتر خوانده شد. با استفاده از معادله زیر درصد فعالیت مهار کنندگی محاسبه شد.

$$\text{درصد جذب رادیکال ABTS} = \frac{(\text{جذب روغن} - \text{جذب نمونه شاهد})}{\text{جذب نمونه شاهد}} \times 100$$

۲-۵- تهیه و آماده سازی سویه های میکروبی

جهت انجام آزمون های میکروبی از سویه های استاندارد میکروبی موجود در کلکسیون میکروبی آزمایشگاه میکروبیولوژی مواد غذایی، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع

¹ *Escherichia coli*

² *Pseudomonas aeruginosa*

³ *Salmonella typhi*

⁴ *Staphylococcus aureus*

⁵ *Listeria monocytogenes*

⁶ *Bacillus cereus*

⁷ Colony forming unit

۸-۲- حداقل غلظت بازدارندگی از رشد^۱

جهت تعیین حداقل غلظت بازدارندگی، محلول اصلی روغن سیاه دانه با رقت ۵۱۲ میلی گرم بر میلی لیتر تهیه و غلظت های مختلف با رقیق سازی محلول های اصلی با محیط کشت مولر هیتون براث (مرک آلمان) آماده شد. ۲۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون تهیه شده بر اساس استاندارد نیم مک فارلند را به چاهک های پلیت ۹۶ خانه ای تزریق شد، سپس ۲۰۰ میکرو لیتر از غلظت های مختلف محلول تهیه شده از روغن سیاه دانه به چاهک اضافه شد. پلیت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوباتور گذاری شد. بعد از آن ۲۰ میکرو لیتر محلول تری فنیل تترازولیوم کلراید (۵ درصد) به هر چاهک اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه مجدداً انکوباتور گذاری شد. پس از سپری شدن این زمان پلیت ۹۶ خانه جهت تغییر رنگ هر چاهک بررسی شد و اولین غلظتی که در آن تغییری رنگی دیده نشد به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی از رشد گزارش شد [۲۴، ۲۵].

۹-۲- تعیین حداقل غلظت کشندگی^۲

به منظور تعیین حداقل غلظت باکتری کشی از خانه هایی که در آن تغییر رنگی مشاهده نشد ۱۰۰ میکرو لیتر به محیط کشت جامد (مولر هیتون آگار) منتقل و ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شد. اولین غلظتی که در آن رشدی مشاهده نشد به عنوان حداقل غلظت کشندگی در نظر گرفته شد [۲۶، ۲۷].

۱۰-۲- برهمکنش روغن سیاه دانه با آنتی بیوتیک کلرامفنیکل

بررسی برهمکنش روغن سیاه دانه با دیسک آنتی بیوتیک کلرامفنیکل با استفاده از روش غلظت تحت مهاری^۳ صورت گرفت که برابر با رقت ۱:۲ MIC بود. رقت تهیه شده به محیط مولر هیتون آگار اضافه شد. محیط کشت حاوی روغن سیاه دانه درون پتری دیش ریخته شد و با کمک سمپلر ۱۰۰ میکرو لیتر سوسپانسیون میکروبی تهیه شده از کشت تازه سویه های میکروبی بیماری زا با غلظت نیم مک فارلند به محیط کشت اضافه شد و دیسک آنتی بیوتیک کلرامفنیکل بر محیط قرار داده شد. از پتری دیش های حاوی محیط کشت مولر هیتون آگار جهت بررسی اثر دیسک آنتی بیوتیکی کلرامفنیکل استفاده شد. پتری دیش ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرم خانه گذاری شدند. پس از این زمان قطر هاله های عدم رشد با

مقیاس میلی متری اندازه گیری و ثبت شد. در ادامه قطر هاله های عدم رشد ایجاد شده در محیط کشت حاوی روغن سیاه دانه را با حالت محیط کشت بدون روغن سیاه دانه مقایسه شد و نوع برهمکنش گزارش شد [۲۸، ۲۹].

۱۱- آنالیز آماری

آزمون ها سه بار تکرار شد و داده ها با استفاده از تحلیل واریانس یک طرفه با کمک نرم افزار **Minitab** (نسخه ۱۷) تجزیه و تحلیل شدند. اختلاف بین میانگین نتایج با استفاده از آزمون **Tukey** در سطح اطمینان ۹۵ درصد بررسی گردید ($p < 0.05$).

۳- نتایج و بحث

میزان ترکیبات فنولی در هر گرم عصاره روغن سیاه دانه **mg GAE/g** $0.57 \pm 16/25$ بود. نتایج آزمون های بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی بر حسب مهار رادیکال های **DPPH** و **ABTS** به ترتیب $0.59 \pm 86/62$ و $0.83 \pm 94/85$ درصد بود (شکل ۱).

¹ Minimum inhibitory concentration (MIC)² Minimum bactericidal concentration (MBC)³ Sub-MIC

رابطه مستقیمی بین محتوای فلاونوئیدی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی وجود ندارد.

مطالعات فراوان و روش‌های متنوعی برای تعیین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی وجود دارد. این روش‌ها تحت تأثیر شرایط مختلف از قبیل دسترسی به مواد آزمایشگاهی و نسبت حلالیت آنتی‌اکسیدان بین فازهای آبی و آلی، میزان دما، شرایط اکسیداسیون، ماده اکسیدشونده و مقدار اکسیداسیون، نتایج متفاوت ارائه می‌دهند؛ لذا استفاده از یک روش برای اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی مناسب نمی‌باشد [۳۷]. اساس روش DPPH بر مبنای احیاء رادیکال آزاد به وسیله آنتی‌اکسیدان‌ها در غیاب سایر رادیکال‌های آزاد در محیط می‌باشد که نتیجه این عمل باعث ایجاد رنگ در محیط میشود که شدت آن با دستگاه طیف‌سنجی قابل اندازه‌گیری است. رادیکال DPPH تشابه کمی به رادیکال پراکسی دارد اما به دلیل سهولت و سرعت این آزمون معمولاً این روش برای بررسی مقدار آنتی‌اکسیدانی در گیاهان و یا برای دانه‌های روغنی استفاده میشود. واکنش رادیکال آزاد DPPH برگشت‌پذیر بوده که این قابلیت بازگشت باعث میشود که ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بسیاری از آنتی‌اکسیدان‌ها معمولاً کمتر از حد مشخص آن‌ها خوانده شود. یکی دیگر از شاخص‌های فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای حاصل از هیدرولیز آنزیمی، مهار رادیکال کاتیونی ABTS و ارزیابی ظرفیت مهار رادیکال آزاد است. از آنجا که آنتی‌اکسیدان‌ها، رادیکال‌های حاصل از اکسیداسیون اسید لینولئیک را مهار می‌کنند، از برهمکنش بین این رادیکال‌ها و بتاکاروتن جلوگیری کرده و در نتیجه از کاهش رنگ بتاکاروتن در اثر این واکنش، میکاهند. بنابراین بین قدرت آنتی‌اکسیدانی مواد شرکت‌کننده در این آزمون و میزان جلوگیری از کاهش رنگ بتاکاروتن، رابطه مستقیمی وجود دارد [۳۰، ۳۱].

نتایج فعالیت ضد میکروبی روغن سیاه‌دانه به روش دیسک دیفیوژن آگار در شکل ۲، آورده شده است. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت روغن سیاه‌دانه از ۶۴ به ۵۱۲ میلی گرم بر میلی لیتر قطر هاله عدم رشد افزایش یافت، به گونه‌ای که در غلظت ۵۱۲ میلی گرم در میلی لیتر قطر هاله عدم رشد به ترتیب لیستریا مونوسیتریز، باسیلوس سرئوس، سودوموناس اثروریزینوزا، استافیلوکوکوس اورئوس، سالمونلا تیفی، شرشیا کلی بود. نتایج به‌دست‌آمده از مقایسه آماری نشان داد که برای تمام باکتری‌های مورد آزمایش

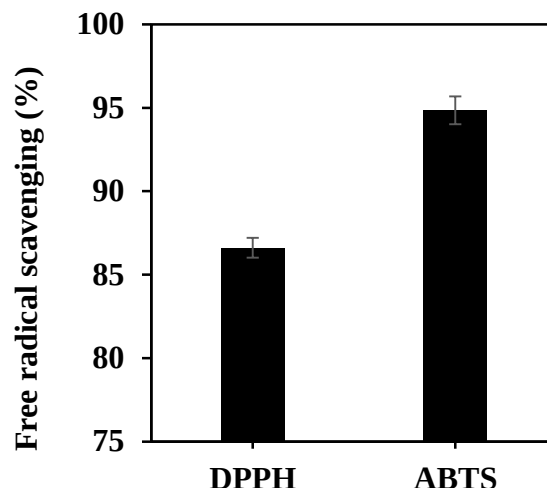


Figure 1. The antioxidant activity of *Nigella sativa* oil based on DPPH and ABTS radical scavenging methods.

برخی از گیاهان دارویی غنی از ترکیبات فنلی و دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی هستند. نتایج مطالعات مختلف بیانگر تفاوت‌هایی در میزان ترکیبات فنلی و همچنین خواص آنتی‌اکسیدانی گیاهان دارویی مشابه است. عوامل بی‌شماری را می‌توان در توجیه این مسئله عنوان نمود. شرایط اقلیمی از جمله آب، هوا، خاک و ارتفاع از عوامل مؤثر بر رشد گیاه و تغییر ترکیبات شیمیایی آن‌ها می‌باشد [۳۰، ۳۱]. روش‌های متنوع اندازه‌گیری ترکیبات فنلی یکی دیگر از عوامل توجیه‌کننده اختلاف در نتایج پژوهش‌های مختلف می‌باشد [۳۱]. مطالعات نشان می‌دهد که بالا بودن ترکیبات فنلی دلیل عمده بالابودن فعالیت آنتی‌اکسیدانی بعضی از گیاهان دارویی می‌باشد. زیرا بر اساس شواهد موجود ارتباط مثبتی بین میزان ترکیبات فنلی و قدرت آنتی‌اکسیدانی گیاهان وجود دارد. از سوی دیگر به نظر می‌رسد که ترکیبات فنلی که به صورت گسترده در گیاهان یافت می‌شوند و قدرت آنتی‌اکسیدانی بالایی دارند، بیشتر از طریق روغن‌های گیاهی آن‌ها قابل استخراج هستند. نقش کلیدی ترکیبات فنلی به عنوان حذف‌کننده‌های رادیکال آزاد در چندین مقاله گزارش شده است. لازم به ذکر است که ترکیبات فنلی به صورت مؤثری به عنوان دهنده هیدروژن عمل نموده و به عنوان یک آنتی‌اکسیدان مؤثر عمل می‌کنند [۳۲-۳۴]. با این وجود طی مطالعات انجام شده توسط تاواها و همکاران (۲۰۱۰) [۳۵] و همچنین چن و همکاران (۲۰۱۰) [۳۶]، مشخص گردید که هیچ

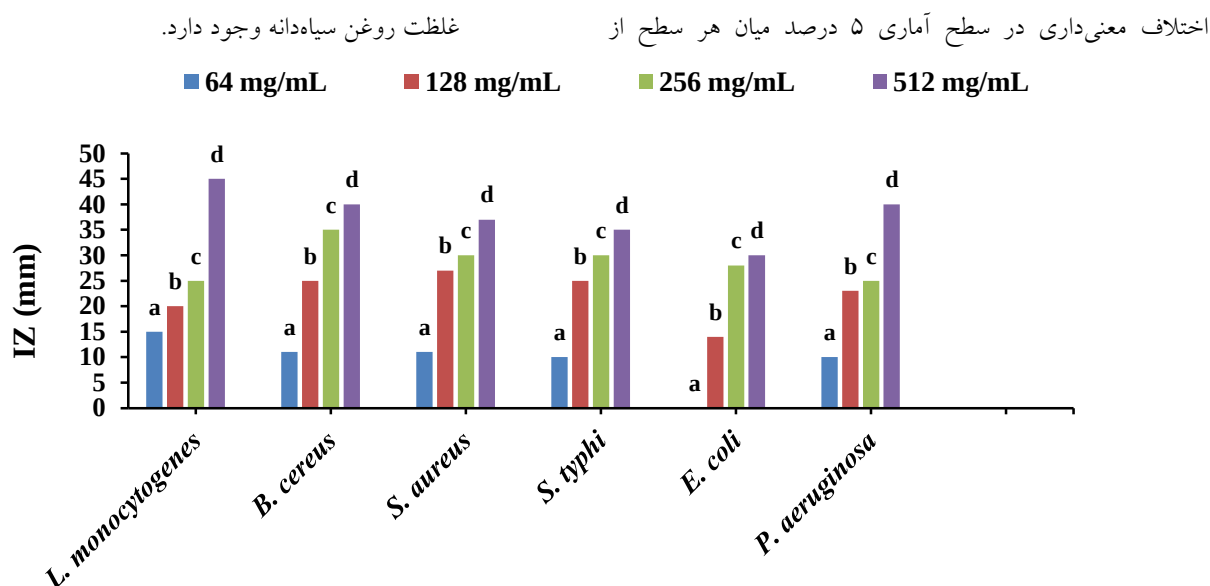


Figure 2. Antibacterial activity of *Nigella sativa* oil based on disc diffusion agar method. Means with different superscripts at each concentration are significantly different ($p < 0.05$).

استافیلوکوکوس اورئوس < لیستریامونوسیتوژنز <
 باسیلوس سرئوس < سودوموناس اثرورینوزا <
 سالمونلا تیفی < اشرشیا کلی بود. مقایسه آماری نشان
 داد که برای تمام باکتری‌های مورد آزمایش اختلاف
 معنی داری در سطح آماری ۵ درصد وجود دارد.

در شکل ۳، نتایج فعالیت ضد میکروبی روغن سیاه دانه
 به روش چاهک آگار نشان داده شده است. نتایج به
 دست آمده نشان داد با افزایش غلظت روغن سیاه دانه
 از ۶۴ به ۵۱۲ میلی گرم بر میلی لیتر قطر هاله عدم رشد
 افزایش یافته است به گونه ای که در غلظت ۵۱۲
 میلی گرم در میلی لیتر قطر هاله عدم رشد به ترتیب

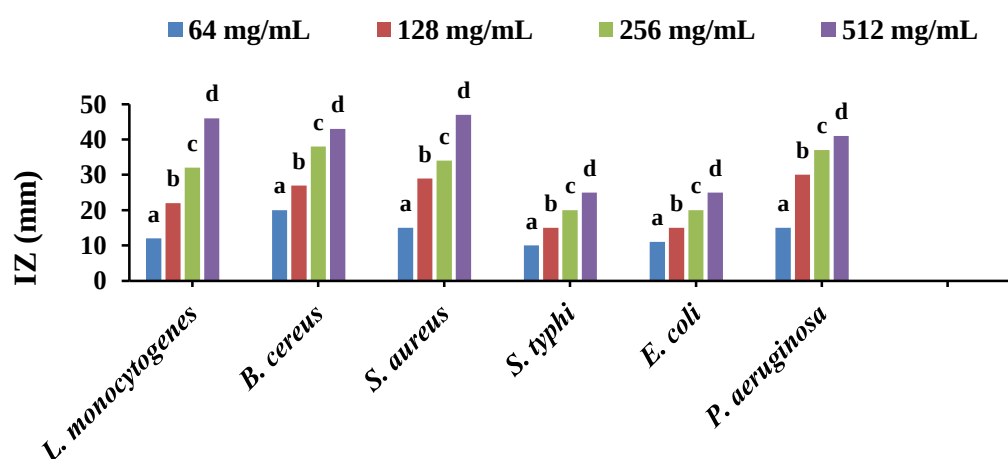


Figure 3. Antibacterial activity of *Nigella sativa* oil based on well diffusion agar method. Means with different superscripts at each concentration are significantly different ($p < 0.05$).

۲، ۲، ۱، ۲ و ۳۲ میلی گرم بر میلی لیتر بود. نتایج نشان داد حداقل غلظت بازدارندگی روغن سیاه دانه برای باکتری‌های لیستریا مونوسیژنوز، باسیلوس سرئوس، استافیلوکوکوس اورئوس، سالمونلا تیفی، اشرشیا کلی و سودوموناس ائروژینوزا به ترتیب ۲۵۶، ۵۱۲، ۲۵۶، ۵۱۲، بزرگتر از ۵۱۲ و ۲۵۶ میلی گرم بر میلی لیتر بود.

نتایج حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی روغن سیاه دانه بر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای مورد مطالعه در جدول ۱، نشان داده شده است. نتایج نشان داد حداقل غلظت بازدارندگی روغن سیاه دانه برای باکتری‌های لیستریا مونوسیژنوز، باسیلوس سرئوس، استافیلوکوکوس اورئوس، سالمونلا تیفی، اشرشیا کلی و سودوموناس ائروژینوزا به ترتیب

Table 1. Antibacterial activity of *Nigella sativa* oil based on MIC and MBC methods

Microorganisms	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)
<i>L. monocytogenes</i>	2	256
<i>B. cereus</i>	2	512
<i>S. aureus</i>	1	256
<i>S. typhi</i>	2	512
<i>E. coli</i>	32	> 512
<i>P. aeruginosa</i>	1	256

نتایج نشان داد که با افزودن روغن سیاه دانه به محیط کشت برای تمام باکتری‌های مورد آزمایش اثر هم‌افزایی اتفاق افتاد.

نتایج قطر هاله عدم رشد دیسک آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل و برهمکنش آن با روغن سیاه دانه بر باکتری‌های بیماری‌زا در جدول ۲، آورده شده است.

Table 3. The mean inhibition zone diameter (mm) of chloramphenicol and its interaction with *Nigella sativa* oil on bacterial pathogenesis

Microorganisms	Chloramphenicol	Chloramphenicol + <i>Nigella sativa</i> oil	Interaction
<i>L. monocytogenes</i>	20.10 ± 0.58	77.30 ± 0.40	Synergistic
<i>B. cereus</i>	25.20 ± 0.43	74.40 ± 0.37	Synergistic
<i>S. aureus</i>	30.50 ± 0.52	78.50 ± 0.50	Synergistic
<i>S. typhi</i>	23.30 ± 0.67	70.90 ± 0.43	Synergistic
<i>E. coli</i>	26.10 ± 0.36	73.10 ± 0.33	Synergistic
<i>P. aeruginosa</i>	24.10 ± 0.41	72.20 ± 0.29	Synergistic

از دیرباز از گیاهان به عنوان دارو استفاده می شده است ولی اخیراً کاربرد گیاهان و مواد تولید شده از آن‌ها به عنوان مواد نگهدارنده و داروی طبیعی بیشتر مورد توجه قرار گرفته است. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که روغن سیاه دانه دارای ترکیبات فنولی می باشد، همچنین فعالیت آنتی اکسیدانی روغن سیاه دانه نیز به اثبات رسید. نتایج فعالیت ضد میکروبی روغن سیاه دانه نشان داد که این روغن می تواند از رشد باکتری های گرم مثبت و باکتری های گرم منفی در شرایط آزمایشگاهی جلوگیری کند. با توجه به خاصیت آنتی اکسیدانی و ضد باکتریایی قابل توجه در روغن سیاه دانه، می توان از این روغن در صنایع غذایی و دارویی استفاده کرد.

۵- تقدیر و تشکر

مقاله حاضر مستخرج از پایان نامه کارشناسی ارشد می باشد، لذا نویسندگان مقاله بر خود لازم می دانند از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان به دلیل حمایت های مادی و معنوی صمیمانه تشکر و قدردانی کنند.

۶- منابع

- [1] Yeganegi, M., Yazdi, F. T., Mortazavi, S. A., Asili, J., Alizadeh Behbahani, B., & Beigbabaie, A. (2018). Equisetum telmateia extracts: Chemical compositions, antioxidant activity and antimicrobial effect on the growth of some pathogenic strain causing poisoning and infection. *Microbial pathogenesis*, 116, 62-67.
- [2] Alizadeh Behbahani, B., Yazdi, F. T., Mortazavi, A., Gholian, M. M., Zendeboodi, F., & Vasiee, A. (2014). Antimicrobial effect of Carboxy Methyl Cellulose (CMC) containing aqueous and ethanolic Eucalyptus camaldulensis L. leaves extract against Streptococcus pyogenes, Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus epidermidis. *Archives of Advances in Biosciences*, 5(2), 59-69.
- [3] Jadoun, S., Arif, R., Jangid, N. K., & Meena, R. K. (2021). Green synthesis of nanoparticles using plant extracts: A review. *Environmental Chemistry Letters*, 19, 355-374.
- [4] Veiga, M., Costa, E. M., Silva, S., & Pintado, M. (2020). Impact of plant extracts upon human health: A review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 60(5), 873-886.
- [5] Ginter, E., Simko, V., & Panakova, V. (2014). Antioxidants in health and disease. *Bratislavske lekarske listy*, 115(10), 603-606.
- [6] Yazdi, F. T., Alizadeh Behbahani, B., Vasiee, A., Mortazavi, S. A., & Yazdi, F. T. (2015). An investigation on the effect of alcoholic and aqueous extracts of Dorema aucheri (Bilhar) on some pathogenic bacteria in vitro. *Archives of Advances in Biosciences*, 6(1), 58-64.
- [7] Falah, F., Shirani, K., Vasiee, A., Yazdi, F. T., & Alizadeh Behbahani, B., . (2021). In vitro screening of phytochemicals, antioxidant, antimicrobial, and cytotoxic activity of Echinops setifer extract. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 35, 102102.
- [8] Alizadeh Behbahani, B., Shahidi, F., Yazdi, F. T., & Mohebbi, M. (2013). Antifungal effect of aqueous and ethanolic mangrove plant extract on pathogenic fungus" in vitro". *International Journal of Agronomy and Plant Production*, 4(7), 1652-1658.
- [9] Yazdi, F. T., & Alizadeh Behbahani, B. (2013). Antimicrobial effect of the aqueous and ethanolic Teucrium polium L. extracts on gram positive and gram negative bacteria "in vitro". *Archives of Advances in Biosciences*, 4(4), 56-62.

۴- نتیجه گیری

زمان زیادی از اثبات فعالیت ضد میکروبی روغن ها، اسانس ها و عصاره های گیاهی سپری شده است؛ اما در سال های اخیر افزایش علاقه مندی ها به توسعه فرآیندهای ارگانیک و طبیعی سبب ازسرگیری بررسی های علمی در ارتباط با این مواد شده است [۳۸-۴۰]. در این بررسی، اثر مهاري روغن سیاه دانه بر رشد تعدادی از باکتری های بیماری زا در شرایط آزمایشگاهی ثابت شد؛ بنابراین می توان از آن به عنوان ترکیب گیاهی در جهت بازدارندگی از رشد باکتری های بیماری زا استفاده کرد. اختلاف در میزان بازدارندگی روغن سیاه دانه بر رشد باکتری های مختلف را می توان به مکانیسم های متفاوت میکروارگانیسم ها در برابر عوامل محدود کننده رشد نسبت داد. آزمایش های صورت گرفته در این پژوهش نشان داد که روغن سیاه دانه اثر ضد باکتریایی مطلوبی دارد. این نتایج نشان می دهد که اختلاف غلظت در مورد سویه های مورد بررسی بسیار حائز اهمیت است.

- [10] Heiss, A. G., & Oegg, K. (2005). The oldest evidence of *Nigella damascena* L.(Ranunculaceae) and its possible introduction to central Europe. *Vegetation history and archaeobotany*, 14, 562-570.
- [11] Ahmad, A., Husain, A., Mujeeb, M., Khan, S. A., Najmi, A. K., Siddique, N. A., Anwar, F. (2013). A review on therapeutic potential of *Nigella sativa*: A miracle herb. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3(5), 337-352.
- [12] Yimer, E. M., Tuem, K. B., Karim, A., Ur-Rehman, N., & Anwar, F. (2019). *Nigella sativa* L.(black cumin): a promising natural remedy for wide range of illnesses. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2019.
- [13] Nickavar, B., Mojab, F., Javidnia, K., & Amoli, M. A. R. (2003). Chemical composition of the fixed and volatile oils of *Nigella sativa* L. from Iran. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 58(9-10), 629-631.
- [14] Ramadan, M. F., & Mörsel, J. T. (2002). Characterization of phospholipid composition of black cumin (*Nigella sativa* L.) seed oil. *Food/Nahrung*, 46(4), 240-244.
- [15] Abbasi, S., Mohammadi, S., & Rahimi, S. (2011). Partial substitution of gelatin with Persian gum and use of Olibanum in production of functional pastille. *Iranian Journal of Biosystems Engineering*, 42(1), 121-131.
- [16] Mehrnia, M. A., Alizadeh Behbahani, B., Barzegar, H., & Tanavar, H. (2021). Sclerorhachis platyrachis essential oil: Antioxidant power, total phenolic and flavonoid content and its antimicrobial activity on some Gram-positive and Gram-negative bacteria "in vitro". *Journal of food science and technology (Iran)*, 18(112), 189-198.
- [17] Noshad, M., Behbahani, B. A., & Nikfarjam, Z. (2022). Chemical composition, antibacterial activity and antioxidant activity of Citrus bergamia essential oil: Molecular docking simulations. *Food bioscience*, 50, 102123.
- [18] Sosani Gharibvand, Z., Alizadeh Behbahani, B., Noshad, M., & Jooyandeh, H. (2020). Investigation of the functional groups of bioactive compounds, radical scavenging potential, antimicrobial activity and cytotoxic effect of Callistemon Citrinus aqueous extract on cell line HT29: A laboratory study. *Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences*, 19(5), 463-484.
- [19] Noshad, M., & Alizadeh Behbahani, B. (2019). Identification of chemical compounds, antioxidant activity, and antimicrobial effect of Elettaria cardamomum essential oil on a number of pathogenic microorganisms in vitro. *Qom University of Medical Sciences Journal*, 13(2), 57-69.
- [20] Saffari Samani, E., Jooyandeh, H., & Alizadeh Behbahani, B. (2020). Evaluation of reciprocal pharmaceutical effect and antimicrobial activity of Shirazi thyme essential oil against some Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Journal of food science and technology (Iran)*, 17(104), 1-11.
- [21] Zanganeh, H., Mortazavi, S. A., Shahidi, F., & Alizadeh Behbahani, B. (2021). Evaluation of the chemical and antibacterial properties of Citrus paradise essential oil and its application in Lallamentia iberica seed mucilage edible coating to improve the physicochemical, microbiological and sensory properties of lamb during refrigerated storage. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15(6), 5556-5571.
- [22] Alizadeh Behbahani, B., & Fooladi, A. A. I. (2018). Antibacterial activities, phytochemical analysis and chemical composition Makhlaheh extracts against the growth of some pathogenic strain causing poisoning and infection. *Microbial pathogenesis*, 114, 204-208.
- [23] Alizadeh Behbahani, B., Jooyandeh, H., Falah, F., & Vasiee, A. (2020). Gamma-aminobutyric acid production by Lactobacillus brevis A3: Optimization of production, antioxidant potential, cell toxicity, and antimicrobial activity. *Food Science & Nutrition*, 8(10), 5330-5339.
- [24] Yousefipour, H., Mehrnia, M. A., Alizadeh Behbahani, B., Jooyandeh, H., & Hojjati, M. (2022). Investigation of the functional groups of bioactive compounds, radical scavenging potential, antimicrobial activity of Trigonella foenum aqueous extract "in vitro". *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 18(4), 415-426.
- [25] Falah, F., Vasiee, A., Alizadeh Behbahani, B., Tabatabaee Yazdi, F., & Mortazavi, S. A. (2021). Optimization of gamma-aminobutyric acid production by Lactobacillus brevis PML1 in dairy sludge-based culture medium through response surface methodology. *Food Science & Nutrition*, 9(6), 3317-3326.
- [26] Alizadeh Behbahani, B., Yazdi, F. T., Shahidi, F., Noorbakhsh, H., Vasiee, A., & Alghooneh, A. (2018). Phytochemical analysis and antibacterial activities extracts of mangrove leaf against the growth of some pathogenic

- bacteria. *Microbial pathogenesis*, 114, 225-232.
- [27] Ebrahimi, Jooyandeh, H., & Noshad, M. (2020). Antimicrobial potential of Cordia myxa fruit on pathogenic bacteria: A study "in vitro" laboratory conditions. *Journal of food science and technology (Iran)*, 17(101), 71-80.
- [28] Barzegar, H., & Mehrnia, M. A., Alizadeh Behbahani, B. (2019). Identification of the chemical compounds and antibacterial activity of Ocimum basilicum essential oil and the effects of its interaction with tetracycline and chloramphenicol antibiotics on some pathogenic microorganisms causing infection and food poisoning. *Journal of food science and technology (Iran)*, 16(90), 113-125.
- [29] Safari, E., Barzegar, H., Jooyandeh, H., Behbahani, B. A., & Noshad, M. (2023). Identification of Functional Groups, Total Phenol and Flavonoids Contents, Antioxidant Potential and Antimicrobial Activity of Black Pepper (Piper nigrum L.) Aqueous Extract and Its Interactions with Chloramphenicol and Amphotericin B. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 19(1), 79-93.
- [30] Alizadeh Behbahani, B., Falah, F., Lavi Arab, F., Vasiee, M., & Tabatabaee Yazdi, F. (2020). Chemical composition and antioxidant, antimicrobial, and antiproliferative activities of Cinnamomum zeylanicum bark essential oil. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2020.
- [31] Alizadeh Behbahani, B., Shahidi, F., Yazdi, F. T., Mortazavi, S. A., & Mohebbi, M. (2017). Antioxidant activity and antimicrobial effect of tarragon (Artemisia dracunculus) extract and chemical composition of its essential oil. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 11, 847-863.
- [32] Candan, F., Unlu, M., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M., Sökmen, A., & Akpulat, H. A. (2003). Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of Achillea millefolium subsp. millefolium Afan. (Asteraceae). *Journal of ethnopharmacology*, 87(2-3), 215-220.
- [33] Chotimarkorn, C., Benjakul, S., & Silalai, N. (2008). Antioxidant components and properties of five long-grained rice bran extracts from commercial available cultivars in Thailand. *Food chemistry*, 111(3), 636-641.
- [34] Küçük, M., Kolaylı, S., Karaoğlu, Ş., Ulusoy, E., Baltacı, C., & Candan, F. (2007). Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. *Food chemistry*, 100(2), 526-534.
- [35] Tawaha, K., Alali, F. Q., Gharaibeh, M., Mohammad, M., & El-Elimat, T. (2007). Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food chemistry*, 104(4), 1372-1378.
- [36] Chan, E., Wong, C. Y.-K., Wan, C.-W., Kwok, C.-Y., Wu, J.-H., Ng, K.-M., . . . Seto, S.-W. (2010). Evaluation of anti-oxidant capacity of root of Scutellaria baicalensis Georgi, in comparison with roots of Polygonum multiflorum Thunb and Panax ginseng CA Meyer. *The American journal of Chinese medicine*, 38(04), 815-827.
- [37] Siahpoosh, A., & Amraee, F. (2011). Antioxidant capacity of various extracts of Asteragalus morinus Boiss aerial parts. *SSU_Journals*, 19(4), 437-444.
- [38] Rahmati-Joneidabad, M., Alizadeh Behbahani, B., & Noshad, M. (2023). Determination of antioxidant activity, and antifungal effect of Ferula persica L hydroalcoholic extract on some fungal strains causing strawberry and grape fruits rot "in vitro". *Research in Plant Metabolites*, 1(2), 5-15.
- [39] Sarghaleh, S. J., Behbahani, B. A., Hojjati, M., Vasiee, A., & Noshad, M. (2023). Evaluation of the constituent compounds, antioxidant, anticancer, and antimicrobial potential of Prangos ferulacea plant extract and its effect on Listeria monocytogenes virulence gene expression. *Frontiers in microbiology*, 14.
- [40] Rahmati-Joneidabad, M., & Alizadeh Behbahani, B. (2022). Chemical properties and evaluation of growth inhibitory and lethal activity of fungi causing spoilage and mold after apple fruit harvest using Salvia mirzayanii essential oil. *Journal of food science and technology (Iran)*, 19(131), 223-231.



Scientific Research

Evaluation of antioxidant activity and antimicrobial effect of *Nigella sativa* oil on some pathogenic bacteria and its interaction with chloramphenicol antibiotic

Ali Zamanpour Boroujeni¹, Behrooz Alizadeh Behbahani^{*2}, Mohammad Amin Mehrnia², Mohammad Hojjati³, Mohammad Noshad²

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.

1- 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.

2- Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran.

ABSTRACT

ARTICLE INFO

Nowadays, with the increase in diseases and consumers' preference for organic foods, the use of natural plant compounds to improve and increase their shelf life is on the rise. In addition, the use of medicinal plants, which can have therapeutic properties, has attracted attention. Black seed oil has attracted a lot of attention in the past due to its unique therapeutic properties. The aim of this study was to investigate the antioxidant activity and evaluate the antimicrobial activity of black seed oil against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus*. The amount of phenolic compounds in black seed oil was measured by Folin-Ciocalteu. The antioxidant activity was determined by DPPH and ABTS radical scavenging methods. The antimicrobial effect of *Nigella sativa* oil was investigated according to well diffusion agar, disk diffusion agar, interaction, minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration methods. The *Nigella sativa* oil had 16.25 mg GAE/g phenolic compounds. The antioxidant activity based on DPPH and ABTS radical scavenging were 86.62% and 94.85%, respectively. The *Nigella sativa* oil showed a significant antimicrobial effect on the tested microorganisms. In the combined mode (interaction) of *Nigella sativa* oil with chloramphenicol antibiotic, synergistic mode was observed for all bacterial strains. Given the significant antioxidant activity and antimicrobial effect of *Nigella sativa*, it can be used in food and pharmaceutical industries.

Article History:

Received: 2023/8/26
Accepted: 2023/10/19

Keywords:

Nigella sativa oil,
Antimicrobial effect,
Antioxidant activity,
Phenolic compounds.

DOI: 10.22034/FSCT.20.145.111

*Corresponding Author E-Mail:
B.alizadeh@asnruk.ac.ir