

بررسی خواص ضد باکتریایی اسانس شیره درخت بنه بر روی باکتری های

استافیلوکوکوس اورئوس، اشیشیا کلی و کلوستریدیوم اسپوروژنس

قربانمحمد حنفی^۱، شعله درویشی^۲، نازیلا درویشی^۳، سید مهدی سیدین اردبیلی^۴، فردین میر احمدی^۵

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران (مؤلف مسؤل) تلفن: ۰۸۷۱-۶۳۸۷۱۱۲ abgh12348@Yahoo.com

۲- کارشناس اداره کل استاندارد کردستان، سنندج، ایران

۳- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج، سنندج، ایران

۴- پزشک عمومی، محقق، مرکز تحقیقات گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران

۵- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

۶- مربی گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج، سنندج، ایران

چکیده

زمینه و هدف: باکتریهای استافیلوکوکوس اورئوس، اشیشیا کلی و کلوستریدیوم اسپوروژنس به طور معمول می توانند مسمومیت‌های غذایی و التهاب‌های گوارشی را در انسان ایجاد کنند. اسانس شیره بنه (*Pistacia atlantica subsp. kurdica*) یا پسته وحشی به عنوان ترکیب ضد میکروبی در مقابل اکثر میکروارگانیسم‌ها شناخته شده است. هدف از این تحقیق تعیین فعالیت ضد میکروبی اسانس بر روی سویه های باکتریایی در شرایط آزمایشگاهی می باشد.

روش بررسی: در این تحقیق، اثرات ضد باکتریایی اسانس الکی شیره بنه، بر روی باکتریهای استافیلوکوکوس اورئوس (PTCC 1431)، اشیشیا کلی (PTCC 1338) و کلوستریدیوم اسپوروژنس (PTCC 1651) در سه تکرار، به روش دیسک کاغذی (تعیین قطر هاله عدم رشد) و رقت سازی در لوله، تعیین حداقل غلظت ممانعت کنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت آنالیز آماری از نرم افزار SPSS و آزمون آماری t استفاده شد.

یافته ها: بر اساس نتایج، فعالیت ضد میکروبی، قطر هاله عدم رشد میکروارگانیسم های استافیلوکوکوس اورئوس، اشیشیا کلی (در غلظت ۵۰ mg/ml) و کلوستریدیوم اسپوروژنس در غلظت (۱۲۰ mg/ml)، به ترتیب $0.4 \pm 11/16$ و $0.3 \pm 8/8$ تعیین شد، که استافیلوکوکوس اورئوس، بیشترین حساسیت و کلوستریدیوم اسپوروژنس بیشترین مقاومت را به اسانس شیره بنه نشان داد.

نتایج حداقل غلظت ممانعت کننده (MIC) برای کلوستریدیوم اسپوروژنس، اشیشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب ۸۰ mg/ml، ۵/۵ و ۰/۶ تعیین شد و همچنین نتایج غلظت کشنده (MBC) برای کلوستریدیوم اسپوروژنس، اشیشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب ۱۲۰، ۸۰ و ۲۰ میلی گرم بر میلی لیتر تعیین گردید.

نتیجه گیری: اسانس الکی شیره بنه بر روی باکتری های کلوستریدیوم اسپوروژنس، اشیشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس نه تنها خاصیت بازدارندگی بلکه خاصیت ضد باکتریایی نیز داشت. با مطالعه اثرات ارگانولپتیک اسانس شیره بنه در غذا می توان به عنوان یک ماده محافظت کننده استفاده نمود.

واژه های کلیدی: درخت بنه، هاله عدم رشد، ضد باکتری، استافیلوکوکوس اورئوس، اشیشیا کلی.

وصول مقاله: ۹۰/۰۱/۲۴ اصلاحیه نهایی: ۹۰/۰۹/۱۷ پذیرش مقاله: ۹۰/۰۹/۱۹

مقدمه

استفاده زیاد از آنتی بیوتیک‌ها منجر به مقاوم شدن میکروب‌های بیمارزا در بدن ما می‌شوند (۱). از زمان‌های قدیم تاکنون گیاهان دارویی (به دلیل داشتن اسانس) نقش مهمی در سلامتی انسان داشته‌اند (۲). *Pistacia atlantica* یکی از این گیاهان دارویی می‌باشد (۳). ایران یکی از دو مرکز اصلی تنوع *Pistacia* یعنی پسته وحشی (از خانواده *Anacardiaceae*^۱ و سازگار با مناطق خشک و نیمه خشک) و تولید کننده اصلی *pistachios* یعنی پسته در دنیا می‌باشد (۱۵-۴). درخت بنه به عنوان منبع تولید رزین (صمغ) یکی از گونه‌های رستنی در سلسله جبال زاگرس و بویژه استان کردستان مطرح می‌باشد (۱۶). نتایج بررسی‌ها نشان می‌دهد که رزین گونه‌های *پیستاسیا*^۲ بر روی باکتری‌های *استرپتوکوکوس موتانس*^۳، *استافیلوکوکوس اورئوس*^۴، *سالمونلا انتریتیدیس*^۵، *باسیلوس سرئوس*^۶، *اشریشیا کلی*^۷، *هلیکوباکتر پیلوری*^۸ و کپک و مخمر، اثر کشندگی دارد (۱۷). نتایج مطالعه ضد باکتریایی اسانس گونه دیگری از جنس *Pistacia*، بر روی سویه‌های باکتریایی، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی* نشان داده است که مقدار MIC در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* ۰/۰۳ mg/ml و در باکتری *اشریشیا کلی* ۴۰ mg/ml می‌باشد (۱۹). نتایج مطالعه هاله عدم رشد شیره جنس *Pistacia*، بر روی سویه باکتری *استرپتوکوکوس* نشان داده است که قطر هاله عدم رشد در غلظت‌های ۲۰ mg/ml و ۵۰ mg/ml بین ۹-۲۷ میلی متر می‌باشد (۱۹). بررسی تاثیر غلظت‌های صفر تا ۱۰ درصد وزنی *mastic*

resin در اتانول ۹۶ درجه بر روی گونه‌های مختلف باکتری *کلوستریدیوم بوتولینوم* نشان داده است که بیشتر گونه‌های نوع A *کلوستریدیوم بوتولینوم* در غلظت‌های بیشتر از ۲ درصد حجمی (v/v) بازدارندگی نسبی را داشتند. در همین مطالعه شاخص بازدارندگی برای اسانس *mastic resin*، ۰/۳ درصد حجمی (v/v) گزارش شد (۱۷). *Pithayanukul* و همکاران (۲۰۰۷) تاثیر ضد باکتریایی اسانس *Zingiber cassumunar* را بر روی باکتری‌های گرم منفی بررسی کردند و مقدار MBC را ۰/۶۲ تا ۲/۵ درصد حجمی گزارش کردند (۱۴). با توجه به اینکه در کشور ما تاثیر ضد باکتریایی اسانس شیره بنه (*subsp. kurdica*) انجام نشده است، هدف از این مطالعه بررسی هاله عدم رشد و تعیین مقدار MIC و MBC ناشی از تاثیر اسانس شیره درخت بنه بر روی سه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیا کلی* و *کلوستریدیوم اسپروژنس* در شرایط تجربی-آزمایشگاهی می‌باشد.

روش بررسی

نوع مطالعه تجربی-آزمایشگاهی است که در آزمایشگاه میکروبیولوژی اداره کل استاندارد کردستان انجام شد، برای تعیین خاصیت ضد باکتریایی اسانس شیره درخت بنه از روش *Filter paper disc diffusion Method* برای تعیین قطر هاله عدم رشد و برای تعیین فاکتور MBC و MIC از روش *Liquid broth culture* استفاده گردید.

روش تهیه اسانس *Pistacia*:

اسانس از شرکت سقر سازی کردستان دریافت شد و به منظور استریل کردن از کاغذ صافی با منافذ ۰/۴ میکرون در شرایط استریل صاف گردید و در دمای ۴۰°C ذخیره سازی گردید (۲۱).

¹ - Anacardiaceae

² - Pistacia

³ - Streptococcus mutants

⁴ - Staphylococcus aureus

⁵ - Salmonella enteritidis

⁶ - Bacillus cereus

⁷ - Escherichia coli

⁸ - Helicobacter pylori

بررسی انتشار دیسک ابتدا از کشت ۲۴ ساعته سوسپانسیون باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیاکلی و کلوستریدیوم اسپروژنس که در هر میلی لیتر حاوی 1×10^8 CFU بود، استاندارد محلول ۰/۵ مک فارلند تهیه شد. به دلیل حلالیت کم اسانس در آب خالص، در محلول حاوی ۰/۴ در صد الکل تهیه گردید. جهت تهیه دیسک های مورد آزمایش، هر دیسک با $15 \mu\text{L}$ از عصاره حاوی اسانس با غلظت های مختلف صفر (شاهد)، ۲۰ و ۵۰ میلی گرم در میلی لیتر، برای باکتری استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیاکلی و غلظت های ۲۰، ۴۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۱۲۰ میلی گرم در میلی لیتر برای باکتری کلوستریدیوم اسپروژنس اشباع گردید. در این آزمایشات از مولر هینتون آگار به عنوان لایه زیرین و از

۰/۱ میلی لیتر محیط کشت مولر هینتون براث حاوی سوسپانسیون میکروبی استفاده گردید. بعد از ریختن محیط حاوی میکروب بر روی لایه زیرین و خشک کردن محیط در انکوباتور خلاء (جهت خشک شدن سریع سطح محیط کشت)، دیسک های تهیه شده در فاصله مناسب از یکدیگر کاشته شدند. محیط های کشت باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیاکلی، برای مدت ۲۴ ساعت در گرم خانه 37°C نگهداری شدند. برای باکتری کلوستریدیوم اسپروژنز به دلیل بی هوازی بودن، محیط کشت به صورت دو لایه (بعد از قرار دادن دیسک ها)، یک لایه از محیط کشت جامد روی محیط ریخته و بعد از بستن محیط در جار بی هوازی قرار داده شد و بعد از برقراری شرایط بی هوازی برای مدت ۲۴ ساعت در گرم خانه 37°C نگهداری شدند. در ادامه قطر هاله های عدم رشد توسط کولیس (کالیبره شده) اندازه گیری و میانگین در جداول ۱ و ۲ خلاصه شد. آزمون، سه بار تکرار گردید و میانگین قطر هاله عدم رشد (مقایسه میانگین) در مقایسه با شاهد (هاله مشاهده نشد) با ضریب اطمینان ۹۹ درصد گزارش گردید (نرم افزار SPSS و تست آماری t تست). همزمان با نمونه ها آزمون شاهد انجام شد، در محیط کشت شاهد (دیسک شاهد) هیچ هاله ای مشاهده نگردید (عدم

محیط های کشت:

در این مطالعه سویه های باکتریایی:

Staphylococcus aureus (PTCC 1431)

و

Escherichia coli (PTCC 1338)

Clostridium sporogenes (PTCC 1651)

به صورت لیوفیلیزه، از سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران تهیه و مورد آزمایش قرار گرفت. در کلیه آزمون های میکروبیولوژیکی که نیاز به محیط آسپتیک بوده از هود لامینار فلو

استفاده شد. آمپول های لیوفیلیزه باکتری ابتدا در شرایط آسپتیک باز و در محیط کشت های توصیه شده توسط سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران (Blood cooked Broth برای استافیلوکوک اسپروژنس، meat EC Broth جهت استافیلوکوکوس اورئوس و جهت اشریشیاکلی) به مدت ۲۴ ساعت در دمای 37°C درجه، گرم خانه گذاری شد و هفت بار از کشت اولیه به کشت دیگر انتقال گردید و فعال سازی شد، برای انجام هر آزمون جهت بررسی اثرات ضد باکتری، کشت تازه ۲۴ ساعته تهیه گردید. با استفاده از پیت استریل به مقدار لازم از محیط کشت تازه ۲۴ ساعته، به لوله های محلول نمکی (غلظت نمک ۰/۹ درصد در آب مقطر) استریل انتقال داده و با دور 3000 U/Min سانتریفوژ گردید. سپس کدورت سوسپانسیون میکروبی تهیه شده با استفاده از محلول ۰/۵ مک فارلند برابر با حدود $1 \text{ CFU/ml} / 1 \times 10^8$ تنظیم گردید. در آزمایشات انتشار دیسک از محیط کشت MHA (مولر هینتون آگار) و در آزمایشات رقت لوله ای از محیط کشت MHB (مولر هینتون براث) استفاده شد (۱۹).

آزمون تاثیر ضد باکتریایی:

قبل از شروع کار و انجام آزمون بر روی اسانس جهت تسهیل روش و بدست آوردن محدوده ضد باکتریایی اسانس، کشت اولیه (Preculture) انجام شد. برای

علامت - (منفی) کاهش رشد معنی دار ($p < 0.01$) است و علامت O (صفر) یعنی رشد صفر، در جداول ۳ و ۴ خلاصه گردید. آزمون سه بار تکرار گردید و میانگین ها در مقایسه با شاهد با ضریب اطمینان ۹۹ درصد گزارش گردید (۱۹).

MBC (*Minimum Bactericidal Concentration*) به روش *Liquid broth culture* برای بررسی حداقل کشندگی اسانس بر روی باکتری های اشریشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس و کلوستریدیوم اسپرووژنس (اصلاح شده) (۲۷ و ۲۸ و ۳۳). قبل از شروع کار و انجام کشتهای آزمون ابتدا کشت اولیه (*Pre-culture*) جهت تسهیل روش انجام شد. جهت بررسی مقدار MBC اسانس بر روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیاکلی و کلوستریدیوم اسپرووژنس مقدار ۰/۵ مک فارلند از باکتری های فوق در غلظت های ۰/۰۳، ۰/۱۵، ۰/۶۲، ۲/۵، ۵/۵، ۱۰، ۲۰، ۵۰ و ۸۰ میلی گرم در میلی لیتر از اسانس برای باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیاکلی و غلظت های ۰/۰۳، ۰/۱۵، ۰/۶۲، ۲/۵، ۵/۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۱۲۰ میلی گرم از اسانس برای باکتری کلوستریدیوم اسپرووژنس در میلی لیتر در محیط کشت آبگوشت مولر هینتون به مدت ۲۴ ساعت گرم خانه گذاری گردید. مقدار MBC از روی عدم تشکیل کدورت در لوله ها تخمین گردید (۱۷)، بدنبال آن کشت های تاییدی برای کشته شدن باکتری ها انجام گردید و آزمون سه بار تکرار گردید و میانگین سه تکرار (توسط نرم افزار SPSS به روش آماری t تست) در مقایسه با شاهد با ضریب اطمینان ۹۹ درصد گزارش گردید (۱۹).

جهت قضاوت در مورد قطر هاله عدم رشد و میزان تاثیر اسانس، از استاندارد قدرت تاثیر اسانس، که توسط Faik Ahmet Ayaz و همکاران بدست آمده است، استفاده شد (۳۴). در این استاندارد در صورتی که قطر هاله کمتر از ۵ میلی متر بود به عنوان اسانس غیر فعال، قطر هاله ۵/۵-۱۰ میلی متر به عنوان نسبتاً فعال، قطر هاله ۱۹-۱۱ میلی متر به عنوان فعال و در

تاثیر آب حاوی ۰/۴ درصد الکل روی باکتری (۱۹). با استفاده از روش رقت لوله ای، حداقل غلظت مهار کنندگی رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی ماده ضد میکروبی (MBC) تعیین گردید (۱۹). برای تعیین MIC (*Minimal inhibition concentration*) به روش *Liquid broth culture*، اسانس بر روی باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیاکلی از ۸ غلظت لوله آزمایش و یک لوله شاهد (فاقد اسانس) و برای کلوستریدیوم اسپرووژنس از ۱۰ غلظت لوله آزمایش و یک لوله شاهد (فاقد اسانس) استفاده شد (۲۹-۲۲ و ۱۹).

قبل از شروع کار و انجام آزمون ابتدا کشت اولیه (*Pre-culture*) جهت تسهیل روش انجام شد. باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیاکلی و کلوستریدیوم اسپرووژنس فعال شده، توسط سانترفیوژ با دور ۳۰۰۰ U/Min به مدت ۷ دقیقه توسط محلول نمکی (غلظت نمک ۰/۹ درصد در آب مقطر) شستشو و غلظت ۰/۵ مک فارلند از باکتری (10^8 CFU/ml × ۱) تهیه گردید و برای اندازه گیری فاکتور MIC استفاده شد. غلظت های مختلف از اسانس حاوی ۰/۰۳، ۰/۱۵، ۰/۶۲، ۲/۵، ۵/۵، ۱۰، ۲۰، ۵۰ و ۸۰ میلی گرم در میلی لیتر برای باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیاکلی و غلظت های ۰/۰۳، ۰/۱۵، ۰/۶۲، ۲/۵، ۵/۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۱۲۰ میلی گرم بر میلی لیتر از اسانس برای باکتری کلوستریدیوم اسپرووژنس در میلی لیتر در محیط کشت مولر هینتون براث به مدت ۲۴ ساعت گرم خانه گذاری گردید و در ادامه بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار (*Mueller-Hinton agar*) به صورت سطحی، کشت و گرم خانه گذاری گردید و شناسایی و شمارش گردید (۳۲-۳۰) و نتایج به صورت، علامت + (مثبت) یعنی عدم کاهش رشد،

صورتی که قطر هاله بزرگتر از ۲۰ میلی متر بود به عنوان بسیار فعال در نظر گرفته شد (۳۴).

یافته ها

با مقایسه میانگین سه تکرار نتایج آزمون قطر هاله عدم رشد و MBC و MIC بدست آمده با شاهد، با ضریب اطمینان ۹۹ درصد در جداول ۱، ۲، ۳ و ۴ خلاصه شده است

جدول ۱- نتایج بررسی قطر هاله عدم رشد (میلی متر) به روش انتشار دیسک در محیط کشت

غلظت اسانس (میلی گرم در میلی لیتر)		شاهد	باکتری
۵۰	۲۰		
۱۱/۱۶±۰/۴	۹±۰/۳	صفر	اشریشیا کلی
۱۳/۱۴±۰/۳۲	۱۱/۲±۰/۴	صفر	استافیلوکوکوس اورئوس

غیر فعال: < ۵ میلی متر نسبتاً فعال: ۱۰-۵/۵ میلی متر فعال: ۱۹-۱۱ میلی متر بسیار فعال: ≥ ۲۰ میلی متر (۳۴) P < ۰/۰۱

جدول ۲- نتایج بررسی قطر هاله عدم رشد (میلی متر) به روش انتشار دیسک در محیط کشت

غلظت اسانس (میلی گرم در میلی لیتر)					شاهد	باکتری
۱۲۰	۱۰۰	۸۰	۴۰	۲۰		
۸/۸±۰/۳	۷/۷۳±۰/۲	۵/۰±۰/۲	-	-	صفر	کلوستریدیوم اسپروژنز

غیر فعال: < ۵ میلی متر نسبتاً فعال: ۱۰-۵/۵ میلی متر فعال: ۱۹-۱۱ میلی متر بسیار فعال: ≥ ۲۰ میلی متر (۳۴) P < ۰/۰۱

همانطور که در جدول ۱ دیده می شود قطر هاله در غلظت ۵۰ میلی گرم در میلی لیتر ۱۳/۱۴±۰/۳۲ و در غلظت ۲۰ میلی گرم در میلی لیتر ۱۱/۲±۰/۴، اندازه گیری شد.

جدول ۱ نشان می دهد که در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب با افزایش غلظت اسانس قطر هاله عدم رشد به صورت معنی دار بیشتر شده است (p < ۰/۰۱).

باشد (۱۱/۲±۰/۴ میلی متر). در این تحقیق قطر هاله در مورد استافیلو کوکوس اورئوس (باکتری گرم مثبت) بیشتر از ۱۰ میلیمتر بدست آمد که در مقایسه با استاندارد، اسانس فعال می باشد (۱۹).

قطر هاله عدم رشد در مورد باکتری استافیلو کوکوس اورئوس در غلظت ۲۰ میلی گرم در میلی لیتر در مقایسه با سایر باکتری ها به صورت معنی دار ($p < 0/01$) بیشتر می

جدول ۳- نتایج بررسی حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) نتایج بررسیهای MIC, MBC

غلظت اسانس (میلی گرم در میلی لیتر)									
۸۰	۵۰	۲۰	۱۰	۵/۵	۲/۵	۰/۶	۰/۱۵	شاهد	باکتری
۰	-	-	-	-	+	+	+	+	اشریشیا کلی
۰	۰	۰	-	-	-	-	+	+	استافیلو کوکوس اورئوس

O: رشد صفر +: عدم کاهش رشد -: کاهش رشد معنی دار ($p < 0/01$)

جدول ۴- نتایج بررسی حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) نتایج بررسیهای MIC, MBC

غلظت اسانس (میلی گرم در میلی لیتر)											
۱۲۰	۱۰۰	۸۰	۴۰	۲۰	۱۰	۵/۵	۲/۵	۰/۶	۰/۱۵	شاهد	باکتری
-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	کلوستریدیوم اسپروژنر

O: رشد صفر +: عدم کاهش رشد -: کاهش رشد معنی دار ($p < 0/01$)

نتایج آزمایشات (جدول ۳ و ۴) نشان داد که مقدار MBC برای استافیلو کوکوس اورئوس، اشریشیا کلی و کلوستریدیوم به ترتیب ۲۰، ۸۰ و ۱۲۰ میلی گرم در میلی لیتر می باشد (O: رشد صفر)

هاله عدم رشد در باکتری اشریشیا کلی:

غلظت اسانس، قطر هاله بیشتر شده است و در غلظت ۵۰ میلی گرم در میلی لیتر قطر هاله ۱۱/۱۶±۰/۴ میلی متر بود و تا حدودی قدرت بازدارندگی بیشتری را دارا می باشد.

بررسی هاله عدم رشد در باکتری گرم منفی (*Escherichia coli* (PTCC 1338) (جدول ۱) در غلظت ۲۰ میلی گرم در میلی لیتر (۹±۰/۳) در مقایسه با غلظت ۵۰ میلی گرم در میلی لیتر (۱۱/۱۶±۰/۴) کمتر می باشد. این نتیجه بیانگر این موضوع می باشد که با افزایش

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان / دوره هفدهم / بهار ۱۳۹۱

فرضیات زیادی وجود دارد با توجه به اینکه غشای سلولی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بیشتر پپتیدوگلیکانی می باشد. بنابراین یکی از فرضیات، متلاشی شدن پمپ پروتون و تغییر چاله ATP می باشد. از احتمالات دیگر در این مورد، نفوذ ترکیبات اسانس به داخل دیواره سلولی و تخریب میتوکندری می باشد، ولی نتیجه گیری قطعی در مورد تاثیر اسانس بر روی ساختارهای درون سلول باکتری نیاز به بررسی توسط میکروسکوپ الکترونی می باشد.

در تحقیق ما حلال مورد استفاده اتانول بود که در این مطالعه با به کارگیری تکنیک بهتر، غلظت حلال کاهش داده شد و به ۰/۴ درصد رسانده شد که در نتیجه تاثیر حلال روی باکتری کمتر بوده و نتایج حاصل شده بیانگر تاثیر غالب اسانس روی باکتری می باشد. نتایج تحقیقات ما در دو غلظت ۲۰ میلی گرم در میلی لیتر و ۵۰ میلی گرم در میلی لیتر اسانس شیره درخت *P. atlantica subsp. kurdica* بر روی باکتری *Staphylococcus aureus* در جدول ۱ مشاهده می شود.

بررسی نتایج هاله عدم رشد در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و مقایسه آن با تحقیقات Ayepola و همکاران (۲۲) نشان می دهد که خاصیت ضد باکتریایی اسانس شیره *P. atlantica subsp. kurdica* تقریباً ۵۰ درصد خاصیت ضد باکتریایی اسانس برگ اکالیپتوس می باشد. به نظر می رسد که ترکیبات فنلی و ترکیبات فرار اسانس از جمله ترکیبات موثر در خاصیت ضد باکتریایی می باشند که بر علیه محدوده بسیار وسیعی از میکروارگانیسمها موثر می باشند (۲۲). بر اساس نتایج جدول ۲ بازدارندگی از غلظت ۸۰ میلی گرم در میلی لیتر شروع شده است و قابل مقایسه با نتایج تحقیقات Daphne Philhps Daifas و همکارانش می باشد (۱۷). خود اشاره کردند که سیستم های آنزیمی ترمیمی، بخصوص آنزیم های که در تولید انرژی دخالت دارند، ممکن است آسیب دیده باشند (۱۷).

هاله عدم رشد در باکتری کلوستریدیوم اسپوروژنس:

در بررسی هاله عدم رشد باکتری بیهواری *Clostridium sporogenes* که از غلظت های ۲۰، ۴۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۱۲۰ استفاده گردید، هاله عدم رشد تا غلظت ۸۰ میلی گرم در میلی لیتر اسانس مشاهده نگردید (جدول ۲) و در غلظت ۱۰۰ میلی گرم در میلی لیتر قطر هاله $7/73 \pm 0/2$ میلی متر بدست آمد، نتایج تحقیق ما نشان داد که با افزایش غلظت اسانس از ۸۰ تا ۱۲۰ میلی گرم در میلی لیتر قطر هاله افزایش یافته است.

MBC و MIC:

همانطور که در جداول ۳ و ۴ نشان داده می شود، حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) در مورد باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس، اشیریشیاکلی و کلوستریدیوم اسپوروژنس به ترتیب ۰/۶، ۵/۵ و ۸۰ میلی گرم در میلی لیتر اندازه گیری شد (-: کاهش رشد معنی دار).

بحث

یافته ها نشان می دهد که تاثیر بازدارندگی اسانس *P. atlantica subsp. kurdica* در مقایسه با *Pistacia lentiscus* قابل مقایسه می باشد. تجزیه و تحلیل نتایج نشان می دهد که در مورد باکتری اشیریشیاکلی، اولاً زمان تاثیر اسانس در مورد اشیریشیاکلی، دوم مهاجرت ترکیبات بازدارنده به اطراف هاله شاید فاکتورهای بازدارنده می باشد. در مورد باکتری اشیریشیاکلی که یک باکتری گرم منفی می باشد و دیواره سلولی این باکتری بیشتر لیپیدی می باشد تا پپتید و گلیکانی، فرضیه کشندگی اسانس (اسانس الکلی) فقط به دلیل تخریب دیواره سلولی، چندان قطعی و صد در صد نمی باشد، به دلیل اینکه، اگر مرگ باکتری فقط به دلیل تخریب دیواره سلولی اشیریشیاکلی بود، در این صورت قدرت کشندگی در مقایسه با استافیلوکوکوس اورئوس بیشتر شده بود. در مورد مکانیسم کشندگی اسانس،

بودن قدرت بازدارندگی اسانس *Pistacia* وجود α -*pinene* باشد. با وجود این نتیجه گیری قطعی در این زمینه کمی مشکل می باشد، به دلیل اینکه ممکن است ترکیبات مختلف اسانس تاثیر تشدید کننده داشته باشند. به نظر می رسد بسیاری از ترکیبات اسانس ها سلول را مورد هدف قرار می دهند. همچنان که ترکیبات لیپوفیل از غشای سیتوپلاسم عبور کرده و ساختار لایه های متفاوت پلی ساکاریدی، اسیدهای چرب و فسفولیپیدی آن را به هم ریخته و مختل می کنند و آنها را نفوذ پذیر می کنند. در باکتری ها نفوذپذیری غشاء با کاهش یون و احیاء پتانسیل غشاء، متلاشی شدن پمپ پروتون و خالی شده چاله ATP مرتبط می باشد. اسانس ها می توانند سیتوپلاسم را کواگوله کرده و به پروتئین ها و لیپیدها آسیب وارد کنند. آسیب به دیواره سلولی و غشای سلولی منجر به نفوذپذیری ماکرومولکول ها می شوند (۱۹).

واکنش های زنجیره ای دیواره سلولی یا غشای بیرونی سلول، کل سلول را مورد حمله قرار داده، از غشای ارگانل (*Organelles*) هایی مانند میتوکندی عبور می کند (۱۹). اسانس ها با نفوذ از دیواره سلولی و غشای سیتوپلاسم، آنها را نفوذ پذیر کرده و مخصوصاً به غشای میتو کندری آسیب وارد می کند. میتو کندری ها با تغییر جریان الکترون از طریق زنجیره انتقال الکترون، رادیکال های آزاد تولید می کنند که به لیپیدها، پروتئینها و DNA آسیب وارد می کنند. علاوه بر این بعضی ترکیبات فنولی اسانس ها در اثر تماس با ROS (*Reactive oxygen species*) اکسیده شده و رادیکال های فنوکسیل خیلی فعالی را تولید می کنند. این نوع از واکنشهای رادیکالی به حضور یونهای فلزی انتقالی سلول مثل Fe^{++} ، Cu^{++} ، Zn^{++} ، Mg^{++} یا Mn^{++} بستگی دارد (۱۵).

نتیجه گیری

نتایج حاکی از آن است که اسانس الکی شیره بنه بر روی باکتری های کلوستریدیوم اسپروژنس، اشریشیا کلی و

نتایج در مورد مقدار MIC بر روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس نشان می دهد که این نتیجه با نتایج تحقیقات انجام شده توسط Faouzia Ben Douissa (۰/۰۳ میلی گرم در میلی لیتر اسانس برگ *Pistacia lentiscus*) قابل مقایسه می باشد. ولی دو نکته قابل ذکر است، اول اینکه که با افزایش غلظت اسانس قدرت بازدارندگی هم اسانس برگ و اسانس شیره بیشتر می شود، دوم اینکه قدرت بازدارندگی اسانس برگ بیشتر از اسانس شیره می باشد (۱۸). Ayepola و همکاران مقدار MIC در اسانس برگ اکالیپتوس (استخراج متانولی) برای باکتری استافیلوکوکوس اورئوس را ۱/۲۵ mg/ml گزارش کردند (۷)، در حالی که این فاکتور در تحقیق ما برای باکتری استافیلوکوکوس اورئوس ۰/۶ mg/ml اندازه گیری شد. این نتایج بیانگر این نکته می باشد که مقدار MIC در تحقیقات ما تقریباً ۵۰ درصد کمتر از نتایج Ayepola و همکاران می باشد. (هر چه مقدار MIC کمتر باشد قدرت ضد باکتریایی بیشتر می باشد). این تفاوت شاید بدلیل تفاوت ترکیبات اسانس شیره *P. atlantica subsp. kurdica* در مقایسه با ترکیبات اسانس برگ اکالیپتوس باشد. به هر حال نتایج تحقیقات ما نشان می دهد که مقدار MIC اسانس شیره درخت بنه بسیار قابل توجه می باشد.

مقایسه مقدار MIC در مورد باکتری اشریشیا کلی در مقایسه با نتایج تحقیقات Faouzia Ben Douissa (۱۰ میلی گرم در میلی لیتر اسانس برگ *Pistacia lentiscus*) نشان می دهد که قدرت بازدارندگی اسانس شیره در مقایسه با برگ بیشتر (تقریباً ۲ برابر) می باشد. نتایج تحقیقات نشان می دهد که α -*pinene* یک ترکیب ضد میکروبی بسیار مهم در اسانس برگ گونه *Pistacia* می باشد (۱۸). با توجه به اینکه مقدار ترکیب فوق در *P. atlantica subsp. kurdica* تقریباً ۷۰ درصد می باشد بنابراین ممکن است، یکی از دلایل بیشتر

تشکر و قدر دانی

از مدیریت محترم اداره کل استاندارد و تحقیقات صنعتی استان کردستان به خاطر زحمات بی دریغ ایشان در تمامی مراحل و شرکت سقز سازی استان کردستان به خاطر تهیه اسانس، کمال تشکر را داریم.

استافیلوکوکوس اورئوس نه تنها خاصیت بازدارندگی نشان داده اند، بلکه خاصیت ضد باکتریایی نیز دارند. با مطالعه اثرات ارگانولپتیک اسانس شیره بنه در غذا، از آن می توان به عنوان یک ماده محافظت کننده استفاده نمود.

References

- 1- James M, Jay. Modern food microbiology. vol 1. Translated by Haddad khodaparast M H, Rezaee mokarram R, Mortazavi A, Nasehi B, Mashhad:Nashr 1993. P: 21-31, 96-97, 477.
- 2- Ilkay O, Berrin O, Sinem A, Murat K, Taner K, Bilge S and et al . Antioxidant and antimicrobial actions of the clubmoss lycopodium clavatum L. *Phytochem Rev* 2007;6:89-196.
- 3- Martinez J I. Impact of a gall-inducing aphid on *Pistacia Atlantica*. *Desf Trees Arthropod-Plant Interactions* 2008;2:147-151.
- 4- Alvarez R, Encina A, Pe´rez Hidalgo N. *Pistacia Terebinthus* L. leaflets: an anatomical study. *Plant Systematics and Evolution* 2008;272:107-118.
- 5- Assimopoulou AN, Papageorgiou VP. GC-MS analysis of penta-and tetra-cyclic triterpenes from resins of *Pistacia* species. Part I. *Pistacia lentiscus* var. *Chia Biomed Chromatogr* 2005;19: 285–311.
- 6- Farhoosh R, Tavakoli J. Aug chemical composition and oxidative stability of kernel oils from two current subspecies of *Pistacia Atlantica* in Iran. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 2008;85:723-729.
- 7- Golan-Goldhirsh A, Barazani O, Wang Z S, Khadka D K, Saunders J A, Kostiukovsky V, Rowland L J. Genetic relationships among mediterranean *Pistacia* species evaluated by RAPD and AFLP markers. *Plant Systematics and Evolution* 2004;246:9–18.
- 8- Ibrahim Basha A, Padulosi S, Chabane K, Hadj-Hassan A, Dulloo E, Augusto Pagnotta M, and et al. Genetic diversity of Syrian pistachio (*Pistacia Vera* L.) varieties evaluated by AFLP markers. *Genet Resour Crop Evol* 2007;54:1807–1816.
- 9- Kafkas S, Perl-Treves R. Morphological and molecular phylogeny of *Pistacia* species in Turkey. *Theor Appl Genet* 2001;102:908-915.
- 10- Karimi H R, Zamani Z, Ebadi A, Fatahi M R. Morphological diversity of *Pistacia* species in Iran. *Genet Resour Crop Evol.* 2009;56:561-571.
- 11-Katz A, Blaustein J, Gurion B, Boker S, Yishay R. Comparison of Mediterranean *pistacia lentiscus* genotypes by random amplified polymorphic DNA, chemical, and morphological analyses. *Journal of Chemical Ecology* 2003;29:1939-1952.
- 12- Kawashty S A, Mosharrafa SAM, El-Gibali M, Saleh N A M. The flavonoids of four *Pistacia* species in Egypt. *Biochemical Systematics and Ecology* 1999;28:915-917.
- 13- Olga T, Ioannis B, Artemios Y. Volatile metabolites of *Pistacia Atlantica* Desf. from Greece. *Flavour and Fragrance Journal* 2007;22:358–362.

- 14- Pazouki L, Mardi M, Salehi Shanjani P, Hagidimitriou M, Pirseyedi S M, Naghavi M R, and et al. Genetic diversity and relationships among Pistacia species and cultivars. *Conserv Genet* 2009;11:311-318
- 15- Zrira S, Elamrani A, Benjilali B. Chemical composition of the essential oil of Pistacia lentiscus L. from Morocco—a seasonal variation. *Flavour and Fragrance Journal* 2003; 18:475-480.
- 16- Rastaghi M E, Shahandashti G L, Boodaghi I. The management of Bene forests. Second "Bene" or "morvarid sabz" national congress. 2001 Sep/Aug. Shiraz, Iran.
- 17- Dophne PD, James PS, Burke B, Greg S, John w A, John K. Effects of mastic resin and its essential oil on the growth of proteolytic Clostridium botulinum. *Int J Food Microbiol* 2004;94:313-322.
- 18- Ben Douissa F, Hayder N, Chekir-Ghedira L, Hammami M, Ghedria K, Mariotte AM and et al. New study of the essential oil from leaves of Pistacia lentiscus L. Anacardiaceae from Tunisia. *Flavour and Fragrance Journal* 2005;20:410-414.
- 19- Aksoy A, Duran N, Koksall F. In vitro and in vivo antimicrobial effects of mastic chewing gum against Streptococcus mutans and mutans streptococci. *Archives of Oral Biology* 2006; 51:476-481.
- 20- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils –A review. *Food and Chemical Toxicology* 2007;46:446-475.
- 21- Jamalian J, Dokhani S, Shahedi M, lame H. 7th vol. Dictionary of Agricultural Science and Natural Resource. Tehran university press. 2008.
- 22- Ayepola OO, Adeniyi BA. The antibacterial activity of leaf extracts of Eucalyptus camaldulensis (Myrtaceae). *Journal of Applied Sciences Research* 2008;4:1410-1413.
- 23- Sheeba E. Antibacterial activity of sultanum surattence BurmF. *Journal of Science, Engineering and Technology* 2010;6:1-4.
- 24- Harrison JJ, Turner RJ, Ceri H. High-throughput metal susceptibility testing of microbial biofilms. *BMC Microbiology* 2005;5:1-11.
- 25- Mota-Meira M, LaPointe G, Lacroix C, Lavoie MC. MICs of mutacin B-Ny266, nisin a, vancomycin, and oxacillin against bacterial Pathogens. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:24-29.
- 26- Ajay Babu P, Srinivas Kumar P, Padmaja P, Khageswara Rao T, Chitti S. MIC database: A collection of antimicrobial compounds from literature. *Biomedical Informatics* 2009;4:75-77.
- 27- Rajarajan S, John NK, Shanthi S. In vitro bactericidal activities of extracts from ripe and unripe fruits of 'Noni'. *Nature Precedings* 2009;10:1-6.
- 28- Cleusix V, Lacroix C, Vollenweider S, Duboux M, Le Blay G. Inhibitory activity spectrum of reuterin produced by lactobacillus reuteri against intestinal bacteria. *BMC Microbiology* 2007;7:1-9.
- 29- Natarajan V, Venugopal PV, Menon T. Effect of Azadirachta Indica (NEEM) on the growth Pattern of dermatophytes. *Indian Journal of Medical Microbiology* 2003;21:98-101.
- 30- ISIRI 2197: 2007. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for enumeration of Clostridium perfringens- Colony-count technique, Karaj 2007:110.
- 31- ISIRI 6806/1: 2005. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Enumeration of coagulase – Positive Staphylococci (Staphylococcus aureus and other species) – Test method Part 1: Technique using Baird – parker agar medium 1st ed., Karaj 2005:404.

- 32- ISIRI.6805:2003. Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the Enumeration of β -glucuronidase – positive *Escherichia coli* Part 2: Colony – count technique at 44° C using 5-bromo – 4-chloro – 3-indolyl β - d glucuronide, Karaj 2003:403.
- 33- Chandrappam S, harsha R, Dinesha R, Gowda T.S.S. Antibacterial activity of *Coleus Aromaticus* Leaves. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 2010;2:63-66.
- 34- Faik Ahmet A, Sema HA,, Sengul AK, Jiri G, Katerina V, Jitka Ulrichova and et al. Phenolic acid contents of kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC) extracts and their antioxidant and antibacterial activities. *Food Chemistry* 2008;107:19-25.