بررسی خواص ضد باکتریایی اسانس شیره درخت بنه بر روی باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیاکلی وکلوستریدیوم اسپوروژنس

قربانمحمد حنفی[۱و۲]، شعله درویشی[۳]، نازیلا درویشی[۴]، سید مهدی سیدین اردبیلی[۵]، فردین میر احمدی[۶]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران (مولف مسوول) تلفن: ۶۳۸۷۱۱۲-۰۸۷۱
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 وکبد، 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، اشریشیا کلی و کلوستریدیوم اسپوروژنز 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 میکروارگانیسم ها 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 الکلی شیره بنه، بر روی باکتریهای استافیلوکوکوس اورئوس (PTCC 1431) ، اشریشیاکلی(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، اشریشیاکلی (در غلظت ۵۰ mg/ml) و کلوستریدیوم اسپوروژنس در غلظت (۱۲۰ mg/ml)، به ترتیب ۰/۳۲ ± ۱۳/۱۴ ، ۰/۴ ± ۱۱/۱۶ و ۰/۳ ± ۸/۸ 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، اشریشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب ۸۰ mg/ml، ۵/۵ و ۰/۶ تعیین شد و همچنین نتایج غلظت کشنده (MBC) برای کلوستریدیوم اسپوروژنس، اشریشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب ۱۲۰، ۸۰ و ۲۰ میلی گرم بر میلی لیتر تعیین گردید.

نتیجه گیری: اسانس الکلی شیره بنه بر روی باکتری های کلوستریدیوم اسپوروژنس، اشریشیا 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 اروئوس، اشریشیاکلی.

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

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-05-15]

مقدمه

استفاده زیاد از آنتی بیوتیک‌ها منجر به مقاوم شدن میکروب‌های بیماریزا در بدن ما می شوند (۱). از زمان‌های قدیم تاکنون گیاهان دارویی (به دلیل داشتن اسانس) نقش مهمی در سلامتی انسان داشته اند (۲). *Pistacia atlantica* یکی از این گیاهان دارویی می باشد (۳). ایران یکی از دو مرکز اصلی تنوع *Pistacia* یعنی پسته وحشی (از خانواده *آناکاردیاسه*[1] و سازگار با مناطق خشک و نیمه خشک) و تولید کننده اصلی *pistachios* یعنی پسته در دنیا می باشد (۱۵-۴). درخت بنه به عنوان منبع تولید رزین (صمغ) یکی از گونه های رستنی در سلسله جبال زاگرس و بویژه استان کردستان مطرح می باشد (۱۶). نتایج بررسی‌ها نشان می دهد که رزین گونه های *پیستاسیا*[2] بر روی باکتری‌های *استرپتوکوکوس موتانس*[3]، *استافیلوکوکوس اورئوس*[4]، *سالمونلا انتریتیدیس*[5]، *باسیلوس سرئوس*[6] ، *اشریشیا کلی*[7] ، *هلیکوباکتر پیلوری*[8] و کپک و مخمر، اثر کشندگی دارد (۱۷). نتایج مطالعه ضد باکتریایی اسانس گونه دیگری از جنس *Pistacia*، بر روی سویه های باکتریایی، استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیاکلی نشان داده است که مقدار MIC در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس ۰/۰۳ mg/ml و در باکتری اشریشیاکلی ۴۰ mg/ml می باشد (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 ۲۷-۹ میلی متر می باشد (۱۹). بررسی تاثیرغلظت‌های صفر تا ۱۰ درصد وزنی *mastic resin* در اتانول ۹۶ درجه بر روی گونه های مختلف باکتری کلوستریدیوم بوتولینوم نشان داده است که بیشتر گونه های 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 Zingibercassumunar را بر روی باکتری های 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 MBC و MIC ناشی از تاثیر اسانس شیره درخت *بنه* بر روی سه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیا کلی و کلوستریدیوم اسپوروژنس در شرایط تجربی- آزمایشگاهی می باشد.

روش بررسی

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

روش تهیه اسانس *Pistacia*:

اسانس از شرکت سقز 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 ۴°C ذخیره سازی گردید (۲۱).

[1]- Anacardiaceous
[2]- Pistacia
[3] - Streptococcus mutants
[4] - Staphylococcus aureus
[5] - Salmonella enteritidis
[6] - Bacillus cereus
[7] - Escherichia coli
[8] - Helicobacter pylori

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-05-15]

محیط های کشت:

در این مطالعه سویه های باکتریایی:

Staphylococcus aureus (PTCC 1431)

و

Escherichia coli (PTCC 1338) و

Clostridium sporogenes (PTCC 1651)

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

استفاده شد. آمپول‌های لیوفیلیزه باکتری ابتدا در شرایط آسپتیک باز و در محیط کشت های توصیه شده توسط سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران (Blood Broth برای استافیلوکوک اسپروژنس، cooked meat جهت استافیلوکوکوس اورئوس و EC Broth جهت ایشریشیاکلی) به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ 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 پیپت 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 ۳۰۰۰U/Min سانتریفوژ گردید. سپس کدورت سوسپانسیون میکروبی تهیه شده با استفاده از محلول ۰/۵ مک فارلند برابر با حدود 1CFU/ml /۱×۱۰^{۸} 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 بررسی انتشار دیسک ابتدا از کشت ۲۴ ساعته سوسپانسیون باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیاکلی و کلوستریدیوم اسپوروژنس که در هر میلی لیتر حاوی ۱×۱۰^{۸}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 دیسک‌های مورد آزمایش، هر دیسک با ۱۵ µL از عصاره حاوی اسانس با غلظت‌های مختلف صفر(شاهد)، ۲۰ و ۵۰ میلی گرم در میلی لیتر، برای باکتری استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیاکلی و غلظت‌های ۲۰، ۴۰، ۸۰، ۱۰۰و ۱۲۰ میلی گرم در میلی لیتر برای باکتری کلوستریدیوم اسپوروژنس 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 باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس واشریشیاکلی، برای مدت ۲۴ ساعت در گرم‌خانه $۳۷^{°C}$ نگهداری شدند. برای باکتری کلوستریدیوم اسپوروژنز به دلیل بی‌هوازی بودن، محیط کشت به صورت دو لایه (بعد از قرار دادن دیسک‌ها)، یک لایه از محیط کشت جامد روی محیط ریخته و بعد از بستن محیط در جار بی‌هوازی قرار داده شد و بعد از برقراری شرایط بی‌هوازی برای مدت ۲۴ ساعت در گرم‌خانه $۳۷^{°C}$ نگهداری شدند. در ادامه قطر هاله‌های 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 هاله‌ای مشاهده نگردید (عدم

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-05-15]

تاثیرآب 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 اسپوروژنس 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 اسپوروژنس 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 ($۱۰^{۸}$ CFU/ml × ۱) تهیه گردید و برای اندازه‌گیری فاکتور MIC استفاده شد. غلظت های مختلف از اسانس حاوی ۰/۰۳، ۰/۱۵، ۰/۶۲، ۲/۵، ۵/۵، ۱۰، ۲۰، ۵۰ و۸۰ 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 و۱۲۰ میلی گرم بر میلی لیتر از اسانس برای باکتری کلوستریدیوم اسپوروژنس 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، 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 اشر یشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس و کلوستریدیوم اسپوروژنس (اصلاح شده) (۳۳و۲۸و۲۷). 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 اسپوروژنس 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 و۸۰ میلی گرم در میلی لیتر از اسانس برای باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیاکلی و غلظت‌های ۰/۰۳، ۰/۱۵، ۰/۶۲، ۲/۵، ۵/۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰، ۱۰۰ و۱۲۰ میلی گرم از اسانس برای باکتری کلوستریدیوم اسپوروژنس 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 ۱۰-۵/۵ میلی متر به عنوان نسبتا" فعال ، قطر هاله ۱۹-۱۱میلی متر به عنوان فعال و در

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-05-15]

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 قطرهاله عدم رشد(میلی متر) به روش انتشار دیسک در محیط کشت

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

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

جدول۲- نتایج بررسی قطرهاله عدم رشد(میلی متر) به روش انتشار دیسک در محیط کشت

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

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

جدول۱ نشان می دهد که در باکتری استافیلو کوکوس اورئوس به ترتیب با افزایش غلظت اسانس قطر هاله عدم رشد به صورت معنی دار بیشتر شده است (p<۰/۰۱)،

همانطور که در جدول۱ 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 لیتر۱۱/۲±۰/۴، اندازه گیری شد.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-05-15]

قطر هاله عدم رشد در مورد باکتری استافیلو کوکوس اورئوس در غلظت ۲۰ میلی گرم در میلی لیتر در مقایسه با سایر باکتری‌ها به صورت معنی دار (p<۰/۰۱) بیشتر می باشد (۰/۴±۱۱/۲ 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).

جدول۳- نتایج بررسی حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و
حداقل غلظت کشندگی (MBC)نتایج بررسیهای MIC, MBC

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

O: رشد صفر +: عدم کاهش رشد -: کاهش رشد معنی دار (p<۰/۰۱)

جدول۴- نتایج بررسی حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و
حداقل غلظت کشندگی (MBC)نتایج بررسیهای MIC, MBC

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

O: رشد صفر +: عدم کاهش رشد -: کاهش رشد معنی دار (p<۰/۰۱)

نتایج آزمایشات (جداول۳و۴) نشان داد که مقدار MBC برای استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیاکلی و کلوستریدیوم به ترتیب ۲۰، ۸۰ و ۱۲۰ میلی گرم در میلی لیتر می باشد (o: رشد صفر

هاله عدم رشد در باکتری اشریشیاکلی:

بررسی هاله عدم رشد در باکتری گرم منفی Escherichia coli *(PTCC 1338*) (جدول ۱) در غلظت ۲۰ میلی گرم در میلی لیتر (۰/۳±۹) در مقایسه با غلظت ۵۰ میلی گرم در میلی لیتر(۰/۴±۱۱/۱۶) کمتر می باشد. این نتیجه بیانگر این موضوع می باشد که با افزایش غلظت اسانس، قطر هاله بیشتر شده است و در غلظت ۵۰ میلی گرم در میلی لیتر قطر هاله ۰/۴±۱۱/۱۶ میلی متر بود و تا حدودی قدرت بازدارندگی بیشتری را دارا می باشد.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-05-15]

هاله عدم رشد در باکتری کلوستریدیوم اسپوروژنس:

در بررسی هاله عدم رشد باکتری بیهوازی *Clostridium sporogenes* که از غلظت‌های ۲۰، ۴۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۱۲۰ استفاده گردید، هاله عدم رشد تا غلظت ۸۰ میلی گرم در میلی لیتر اسانس مشاهده نگردید (جدول۲) و در غلظت ۱۰۰ میلی گرم در میلی لیتر قطر هاله ۰/۲±۷/۷۳ 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.

MIC وMBC :

همانطور که در جداول ۳ و ۴ نشان داده می شود، حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) در مورد باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیاکلی و کلوستریدیوم اسپوروژنز به ترتیب ۰/۶، ۵/۵ و۸۰ 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 اشریشیاکلی، اولا" زمان تاثیر اسانس در مورد اشریشیاکلی، دوم مهاجرت ترکیبات بازدارنده به اطراف هاله شاید فاکتورهای بازدارنده می باشد. در مورد باکتریی اشریشیاکلی که یک باکتری گرم منفی می باشد و دیواره سلولی این باکتری بیشتر لیپیدی می باشد تا پپتید وگلیکانی، 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 اشریشیاکلی بود، در این صورت قدرت کشندگی در مقایسه با استافیلوکوکوس اورئوس بیشتر شده بود. در مورد مکانیسم کشندگی اسانس، 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 تاثیرغالب 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*، تقریبا" ۵۰ درصد خاصیت ضد باکتر یایی 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).

Daphne Philhps Daifas و همکارانش در تحقیقات خود اشاره کردند که سیستم های آنزیمی ترمیمی، بخصوص آنزیم‌های که در تولید انرژی دخالت دارند، ممکن است آسیب دیده باشند (۱۷).

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-05-15]

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 لیتراسانس 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 مقدارMIC در تحقیقات ما تقریبا" ۵۰ درصد کمتر از نتایج Ayepola و همکاران می باشد. (هرچه مقدارMIC 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 اشریشیاکلی در مقایسه با نتایج تحقیقات Faouzia Ben Douissa (۱۸) (۱۰ میلی گرم در میلی لیتراسانس برگ *Pistacia lentiscus*) نشان می دهد که قدرت بازدارندگی اسانس شیره در مقایسه با برگ بیشتر(تقریبا" 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* تقریبا ۷۰ درصد می باشد بنابراین ممکن است، یکی از دلایل بیشتر 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 لایه‌های متفاوت پلی ساکاریدی ، اسیدهای چرب و فسفولیپیدی آن را به هم ریخته و مختل می کنند و آنها را نفوذ پذیر می کند. در باکتری‌ها نفوذپذیری غشاء با کاهش یون و احیاء پتانسیل غشاء، متلاشی شدن پمپ پروتون و خالی شده چاله ATP مرتبط می‌باشد. اسانس‌ها می‌توانند سیتوپلاسم را کواگوله کرده و به پروتئین‌ها و لیپیدها آسیب وارد کنند. آسیب به دیواره سلولی و غشای سلولی منجر به نفوذپذیری ماکرومولکول‌ها می شوند (۱۹).

واکنش‌های 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). اسانس‌ها با نفوذ از دیواره سلولی و غشای سیتوپلاسم، آنها را نفوذ پذیر کرده و مخصوصا" به غشای میتو کندری آسیب وارد می کند. میتو کندری ها با تغییر جریان الکترون از طریق زنجیره انتقال الکترون، رادیکال‌های آزاد تولید می کنند که به لیپیدها، پروتئینها و DNA آسیب وارد می کنند. علاوه بر این بعضی ترکیبات فنولی اسانس‌ها در اثر تماس با ROS (*Reactive oxygen species*) اکسیده شده و رادیکال‌های 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 الکلی شیره بنه بر روی باکتری‌های *کلوستریدیوم اسپوروژنس، اشریشیا کلی و*

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-05-15]

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.

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.

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- KafkasS, 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- OlgaT, Ioannis B, Artemios Y. Volatile metabolites of Pistacia Atlantica Desf. from Greece. Flavour and Fragrance Journal 2007;22:358–362.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-05-15]

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, Koksal 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. Antibacterialm activity of sulanum surattence BurmF. Journal of Science, Engineerinc 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.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-05-15]

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 using5- 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 oleraceae L. var. acephala DC) extracts and their antioxidant and antibacterial activities. Food Chemistry 2008;107:19-25.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-05-15]