ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی و ضداکسیدانی اسانس دارابی (Citrus grandis) روی سویه‌های استاندارد باکتریایی

محدثه شجاعی مهر[1]، مصطفی علم هولو[2*]

تاریخ دریافت ۱۳۹۹/۱۲/۰۳ تاریخ پذیرش ۱۴۰۰/۰۲/۲۲

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: ترکیبات طبیعی به علت داشتن عوارض جانبی کم‌تر و تجزیه زیستی بهتر در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌ها موردتوجه زیادی قرار گرفته‌اند. هدف از این تحقیق بررسی اثر ضدباکتریایی و ضداکسیدانی اسانس برگ و پوست گیاه دارابی بر روی برخی باکتری‌های بیماریزای انسانی هست.

مواد و روش کار: پوست و برگ گیاه دارابی از شمال ایران تحت نظر مرکز تحقیقات مرکبات جمع‌آوری شدند (رامسر، مازندران). اسانس گیری با استفاده از دستگاه کلونجر انجام گرفت. در این مطالعه تجربی فعالیت ضدباکتریایی، حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی به ترتیب با روش انتشار چاهک در آگار و براث میکرودایلوشن و همچنین از معرف ۲،۲-دی فنیل-۱- پیکریل هیدرازیل برای فعالیت ضد رادیکالی بر مبنای درصد مهار رادیکال آزاد استفاده شد.

یافته‌ها: اسانس برگ بیش‌ترین اثر بازدارندگی بر روی باکتری *باسیلوس سرئوس* (۰/۵±۳۲/۵ میلی‌متر) نشان داد. به‌طور کلی اسانس برگ دارابی در مقایسه با اسانس پوست اثر بازدارندگی بهتری نشان داد. حداقل غلظت بازدارندگی اسانس برگ بر روی باکتری *باسیلوس سرئوس* برابر با ۰/۶۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر و حداقل غلظت بازدارندگی اسانس پوست بر روی باکتری‌های *باسیلوس سابتیلیس، استافیلوکوکوس اورئوس، میکروکوکوس لوتئوس* و *سودوموناس آئوروژینوزا* برابر ۰/۶۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. با افزایش غلظت اسانس میزان مهار رادیکال‌های آزاد افزایش یافت. اسانس برگ بیشترین میزان IC_{50} را نشان داد.

بحث و نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج به دست آمده، اسانس دارابی خواص ضد باکتریایی و ضد اکسیدانی قوی نشان داد. در صورت فراوری ترکیبات اسانس دارابی می‌توان آن را برای تحقیقات کاربردی جهت تولید آنتی بیوتیک ها و سنتز داروهای ضدمیکروبی در بخش پزشکی و داروسازی توصیه کرد.

کلیدواژه‌ها: دارابی، اسانس، ضد رادیکال، ضد باکتریایی

مجله مطالعات علوم پزشکی، دوره سی و دوم، شماره چهارم، ص ۲۵۱-۲۴۳، تیر ۱۴۰۰

آدرس مکاتبه: انستیتو علوم و تکنولوژی مدرن، دانشگاه روژاوا، قامیشلو، سوریه، تلفن: ۹۶۳۹۳۸۹۸۶۵۲۴+

Email: mostafaalamholo@yahoo.com

مقدمه

دارابی درختی نازک با برگ‌های بزرگ و میوه کروی می‌باشد. امروزه به علت توسعه مقاومت میکروبی در مقابل برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها، سبب توجه دانشمندان به تحقیقات در جهت یافتن ترکیبات ضدمیکروبی جدید مؤثر علیه عفونت‌های بالینی ناشی از باکتری‌ها، قارچ‌ها و ویروس‌ها از منابع گوناگون بالاخص منابع گیاهی گردیده است (۱). روغن‌های اسانسی ترکیبات مایع و روغنی معطری هستند که از قسمت‌های مختلف گیاه به دست می‌آیند (۲). پوست میوه مرکبات حاوی اسانس با منبعی غنی از ترکیب‌های معطر و دارویی می‌باشد (۳). اولین اندازه‌گیری از ویژگی‌های باکتری‌کشی بخار روغن اسانس توسط دی لا کرویکس در سال ۱۸۸۱ انجام شده است (۴). استفاده از گیاهان دارویی و مواد طبیعی در کشور چین دارای قدمت چند هزارساله بوده و از اسانس گیاهی در گیاه درمانی و مراسم مذهبی و سنتی استفاده می‌شد (۵).

اسانس‌ها حاوی ترکیبات فرارآروماتیک و چربی دوست می‌باشند (۶). روغن‌های اسانسی دارای مصارف عمده دارویی اغلب از دو گروه ترکیبات شیمیایی ترپن و آروماتیک تشکیل شده‌اند (۷). روغن‌های اسانس با جلوگیری از سنتز DNA، RNA، پروتئین‌ها، پلی‌ساکاریدها و تغییر دیواره سلولی در سلول باکتری‌ها باعث تغییراتی مشابه با اثرات عمل آنتی‌بیوتیک‌ها می‌شوند (۸). ایجاد مقاومت باکتریایی در برابر داروهای ترکیبی مانند اسانس‌های گیاهی در مقایسه با داروهایی که از یک ترکیب ساخته شده‌اند، آهسته‌تر است (۹). باکتری‌های گرم مثبت در مقابل باکتری‌های

[1] فارغ التحصیل کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

[2] گروه بیوتکنولوژی، انستیتو علوم و تکنولوژی مدرن، دانشگاه روژاوا، قامیشلو، سوریه (نویسنده مسئول)

گرم منفی در برابر اسانس و عصاره‌های گیاهی حساسیت بهتری نشان می‌دهند (۱۰). اسانس‌مرکبات دارای اثراتی ازجمله، ضد میکروب (۱۱)، ضد قارچ (۱۲)، ضداکسیدان و ضد باکتری (۱۳) می‌باشد. ترکیباتی مانند دی آل- لیمونن، بتا میرسن، آلفا پینن، سابینن، دلتا تری کارن، آلفا ترپینولن از اسانس برگ و پوست مرکبات گزارش شده‌اند که اکثراً دارای خواص ضدمیکروبی می‌باشند (۱۴). خواص ضد اکسیدانی و ضد میکروبی عصاره پوست دارابی گزارش شده است (۱۵).

ترکیب دی لیمونن دسایکلیک آلدئید با خاصیت ضد میکروبی از اسانس پوست پرتقال گزارش شده است (۱۶). گیاهان دارویی حاوی ترکیبات با خاصیت آنتی‌اکسیدان باعث کاهش خطر ابتلا به بیماری‌های قلبی و عدم رشد و پیشرفت سرطان می‌شوند (۱۷). آنتی‌اکسیدان‌ها قادرند در مقادیر کم، غشاهای سلولی و ترکیبات مختلف موجود زنده را در مقابل اکسیدان‌ها حفظ کنند (۱۸). بسیاری از ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی مانند کلاته‌کنندگی فلزات و خاصیت جاروب‌کنندگی رادیکال‌های آزاد می‌باشند. هدف از این تحقیق بررسی فعالیت ضدباکتریایی و ضد اکسیدانی اسانس برگ و پوست دارابی علیه ده سویه استاندارد باکتریایی در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد.

مواد و روش کار

مواد شیمیایی: آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین و سیپروفلوکساسین از شرکت (پادتن تب، ایران)، دستگاه کلونجر ۱۰ سی‌سی از شرکت (ایزوگلاس - ایران)، محیط کشت‌های نوترینت براث، مولر هینتون آگار، آسکوربیک اسید و DPPH از شرکت (مرک، آلمان) خریداری شدند.

جمع‌آوری گیاه و روش اسانس گیری:

مواد گیاهی مورد استفاده در این پژوهش تجربی شامل پوست و برگ گیاه دارابی *Citrus grandis* از شمال ایران (رامسر) زیر نظر مرکز تحقیقات مرکبات استان مازندران جمع‌آوری شدند. اسانس گیری با استفاده از دستگاه کلونجر به روش تقطیر با آب صورت گرفت. بدین منظور، ۱۰۰ گرم از پودر پوست و برگ به‌طور مستقیم در داخل آب به مدت ۵ ساعت حرارت و بخارهای حاصل پس از عبور از لوله‌های سردکننده دستگاه کلونجر مایع‌شده و سپس با استفاده از انهیدراز سدیم سولفات آب‌گیری شد (۱۹).

تهیه سویه‌های باکتریایی استاندارد:

سویه‌های باکتریایی: *باسیلوس سرئوس Bacillus cereus* (PTCC1247)، *استرپتوکوکوس پیوژنز Streptococcus pyogenes* (PTCC1447)، *میکروکوکوس لوتئوس Micrococcus luteus* (PTCC1110)، *باسیلوس سوبتیلیس Bacillus subtilis* (PTCC1156)، *اشریشیا کولی Escherichia coli* (ATCC25922)، *شیگلا بویدی Shigella boydi*، *سالمونلا تیفی Salmonella typhi* (PTCC1609)، *انتروباکتر آئروژنز Enterobacter aerogenes* (PTCC1221)، *سودوموناس آئروژینوزا Pseudomonas aeruginosa* (PTCC1181) و *استافیلوکوکوس اورئوس Staphyllococcus aureus* (PTCC1189) از دانشگاه علوم پزشکی استان همدان تهیه شدند. غلظت سوسپانسیون باکتری معادل $۱/۵\times۱۰^{۸}$ باکتری در میلی‌لیتر تعیین شد (۲۰).

فعالیت ضدباکتریایی به روش انتشار چاهک در آگار[1]:

جهت تست فعالیت ضدباکتریایی اسانس گیاهی از سه غلظت ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استفاده شدند. بدین منظور ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکرولیتر از اسانس‌های گیاهی حاصل از روش تقطیر با آب به ترتیب در ۹۰۰، ۸۰۰ و ۶۰۰ میکرولیتر حلال دی متیل سولفوکساید (DMSO) حل گردید. پس از کشت چمنی باکتری‌ها بر روی محیط کشت مولرهینتون و نوترینت آگار، چاهک‌هایی با قطر ۵ میلی‌متر در محیط کشت ایجاد و سپس ۵۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف هر یک از اسانس‌ها در چاهک‌ها ریخته شد (۲۱).

دیسک‌های آنتی‌بیوتیک جنتامایسین با غلظت ۱۰ میکروگرم و آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین ۵ میکروگرم به‌عنوان کنترل مثبت (۶) و حلال دی متیل سولفوکساید به‌عنوان کنترل منفی انتخاب شدند. اندازه قطر هاله بازدارندگی رشد باکتری در اطراف چاهک برحسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد.

حداقل غلظت بازدارندگی[2] و حداقل غلظت کشندگی[3]:

جهت بررسی حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی از پلیت ۹۶ خانه استریل با روش براث میکرودایلوشن استفاده شد (۲۲). بدین منظور ۹۵ میکرولیتر از محیط کشت نوترینت‌براث داخل هر کدام از ۹۶ چاهک ریخته شد. به چاهک اول ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره ۴۰ میکروگرم بر میلی لیتر اضافه، سپس ۱۰۰ میکرولیتر از چاهک اول به چاهک دوم و به همین ترتیب تا چاهک آخر ادامه یافت. سرانجام رقت‌های سریالی یک دوم (۲۰، ۱۰، ۵، ۲/۵، ۱/۲۵ و ۰/۶۲ میکروگرم بر میلی لیتر) برای هر چاهک به دست آید. در مرحله آخر ۵ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری معادل ۱۰۸ ×۱/۵ باکتری در میلی لیتر به همه چاهک‌های میکروپلیت اضافه شد. سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس

[1] Agar well diffusion method
[2] Minimum inhibitory concentration
[3] Minimum bactericidal concentration

انکوبه شـــدند. کم‌ترین رقت که در آن کدورتی مشـــاهده نگردید، بـه‌عنوان MIC در نظر گرفتـه شـــد. برای تعیین حـداقل غلظت کشـندگی، چاهک‌های حاوی عدم رشـد باکتری، در سـطح محیط کشـت مولرهینتون‌آگار کشـت و به مدت ۲۴ سـاعت در دمای ۳۷ درجه سـلسـیوس قرار داده شـدند. کم‌ترین رقت که در آن رشـد باکتری مشـاهده نگردید به‌عنوان MBC در نظر گرفته شـد (۲۰). چاهک حاوی محیط کشـت نوترینت براث همراه با اسـانس فاقد باکتری به‌عنوان (کنترل مثبت) و چاهک دیگر حاوی محیط کشت بدون اسانس و دارای باکتری (کنترل منفی) در نظر گرفته شدند.

بررسی فعالیت آنتی‌رادیکالی به روش DPPH[4]:

فعالیت رادیکال آزاد با اسـتفاده از روش اسـتوجیسـویک و همکـاران (۲۳) انجـام شـد. از معرف ۲،۲-دی فنیل-۱- پیکریل هیدرازیل (DPPH) اسـتفاده گردید. در این تحقیق غلظت‌های ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اسـانس تهیه و از آسکوربیک اسـید به‌عنوان استاندارد استفاده شد (۲۴). بعد از ۳۰ دقیقه جذب نمونه‌ها با دسـتگاه اسپکتوفتومتر در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت (۲۰) و IC_{50} اسانس‌ها و اسید آسکوربیک محاسبه شد. IC_{50} بیانگر غلظتی از نمونه اسـت که باعث مهار ۵۰ درصـد رادیکالهای آزاد DPPH می‌شـود. میزان درصـد فعالیت آنتی رادیکالی از طریق فرمول زیر محاسبه گردید.

جذب بلانک / جذب نمونه - جذب بلانک = درصد بازدارندگی رادیکال آزاد

آنالیز آماری:

نتایج این پژوهش در قالب آزمون فاکتوریل با طرح پایه کاملاً تصادفی و مقایسه میانگین با آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد با نرم‌افزار SPSS ۱۶ انجام شد.

یافته‌ها

بررسی فعالیت ضدباکتریایی:

پس از حفر چاهک و انکوباسیون، اندازه قطر هاله ممانعت از رشد باکتری در اطراف چاهک‌ها اندازه‌گیری و ثبت گردید. کنترل منفی که حاوی ۵۰ میکرولیتر از حلال دی متیل سولفوکساید، اثر بازدارندگی روی رشد باکتری‌های تست شده نداشت. قطر هاله بازدارندگی اسانس برگ و پوست دارابی در غلظت‌های مختلف بر علیه چند سویه باکتریایی در جدول (۱) آورده شده است.

بیش‌ترین اثر بازدارندگی مربوط به اسانس برگ بر روی باکتری *باسیلوس سرئوس* (۳۲/۵±۰/۵ میلی‌متر) و اسانس پوست بر روی باکتری *میکروکوکوس اورئوس* (۲۷/۵±۰/۵ میلی متر) مشاهده‌گردید. به‌طور کلی، اسانس برگ اثر ضدباکتریایی بهتر و قطر هاله بازدارندگی بزرگ‌تری در مقایسه با اسانس پوست نشان داد. در غلظت‌های ۲۰ و ۴۰ میکروگرم برمیلی لیتر اثر اسانس برگ روی باکتری‌های *باسیلوس سرئوس* و *انتروباکتر آئروژنز* و اسانس پوست بر روی باکتری‌های *میکروکوکوس لوتئوس*، *باسیلوس سرئوس* و *انتروباکتر آئروژنز* در مقایسه با آنتی بیوتیک جنتامایسین بیشتر بود. اسانس برگ در غلظت ۴۰ میکروگرم بر میلی لیتر اثر بازدارندگی بیشتری در مقایسه با آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین بر روی رشد باکتری *باسیلوس سرئوس* نشان داد.

جدول (۱): قطر هاله بازدارندگی (میلی متر) غلظت‌های مختلف اسانس برگ و پوست دارابی روی چند سویه استاندارد باکتریایی (میانگین±خطای استاندارد)

باکتری	برگ			پوست			جنتامایسین	سیپروفلوکساسین
	غلظت (میکروگرم بر میلی لیتر)			غلظت (میکروگرم بر میلی لیتر)				
	۱۰	۲۰	۴۰	۱۰	۲۰	۴۰		
B subtilis	۱۹±۱	۲۴/۵±۰/۵	۲۵±۰/۵	۱۰/۵±۱/۵	۱۳±۱	۱۵/۵±۰/۵	۰/۵۷±۲۸	۰/۳۳±۲۹/۵
B. cereus	۲۴/۵±۰/۵	۲۵/۵±۰/۵	۳۲/۵±۰/۵	۱۹±۰۰	۲۲/۵±۰/۳۳	۲۴/۵±۱/۵	۰/۳۳±۱۹/۶۶	۰/۶۶±۲۸/۵
S.aureus	۱۴/۵±۰/۵	۱۶±۱	۱۷/۵±۰/۵	۱۴±۱	۱۴±۱	۱۵/۵±۱/۲	۱±۲۰	۰/۶۶±۲۸/۵
M.luteus	۱۰±۱	۱۲/۵±۰/۵	۱۴/۵±۰/۵	۱۶/۵±۰/۵	۲۲/۵±۰/۸۸	۲۷/۵±۰/۵	۰/۳۳±۲۲	۱±۳۰
aerogenes.E	۱۵/۵±۰/۵	۱۸/۵±۰/۵	۲۱/۵±۰/۵	۱۵±۱/۵	۲۰±۱	۲۳/۵±۰/۵	۰/۳۳±۱۶/۵	۰/۳۳±۲۸
S. typhi	۲۲/۵±۰/۵	۲۳±۱/۵	۲۳/۵±۰/۵	۲۳±۱	۲۴/۵±۰/۵	۲۶±۰۰	۱±۲۹/۵	۰/۵۷±۳۳
P.aeruginosa	۱۱/۵±۰/۳۳	۱۲/۵±۰/۵	۱۴±۱	۱۳/۵±۰/۵	۱۴±۱	۱۶/۵±۰/۳۳	۰/۳۳±۲۰	۰/۶۶±۲۴/۵

[4] 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

E. coli	۱۲±۰۰	۱۶/۵±۰/۸۸	۱۸/۵±۰/۳۳	۱۰/۵±۰/۵	۱۵±۱	۱۷/۵±۰/۵	۱±۱۹/۵	۰/۵۷±۲۴/۵
S. pyogenes	۱۱/۵±۰/۵	۱۳±۱	۱۵/۵±۰/۵	۱۰/۵±۰/۳۳	۱۲±۰۰	۱۳/۵±۱/۵	۰/۵۷±۲۰	۰/۳۳±۳۱/۵
Sh. boydii	۱۳/۵±۰/۵	۱۴/۵±۱/۲	۱۶/۵±۱/۵	۹/۵±۰/۵	۱۱/۵±۰/۳۳	۱۴/۵±۱/۲	۰/۵۷±۱۹	۰/۶۶±۳۷/۵

حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی:

نتایج حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی رشد اسانس‌ها بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون محیط کشت حاوی باکتری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس ثبت گردید. بر اساس نتایج به دست آمده حداقل غلظت بازدارندگی رشد اسانس برگ بر روی باکتری *باسیلوس سرئوس* برابر با ۰/۶۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر و حداقل غلظت کشندگی هم مربوط به باکتری‌های *باسیلوس سرئوس* و *سالمونلا تیفی* برابر با ۱/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. حداقل غلظت بازدارندگی اسانس پوست بر روی باکتری‌های *باسیلوس سابتیلیس*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *میکروکوکوس لوتئوس* و *سودوموناس آئروژینوزا* برابر با ۰/۶۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر و حداقل غلظت کشندگی مربوط به *باکتری باسیلوس سابتیلیس* و *میکروکوکوس لوتئوس* برابر با ۱/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. به‌طور کلی باکتری‌های گرم مثبت در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی اثر بازدارندگی و کشندگی در غلظت‌های پایین نشان دادند. اسانس برگ در مقایسه با اسانس پوست اثر بازدارندگی و کشندگی بهتری نشان داد (جدول ۲).

جدول (۲): مقادیر MIC و MBC (میکروگرم بر میلی لیتر) اسانس پوست و برگ دارابی روی چند سویه استاندارد باکتریایی

باکتری گرم مثبت	برگ		پوست		باکتری گرم منفی	برگ		پوست	
	MIC	MBC	MIC	MBC		MIC	MBC	MIC	MBC
B. subtilis	۵	۵	۰/۶۲	۱/۲۵	E. aerogenes	۱۰	۱۰	۲/۵	۵
B. cereus	۰/۶۲	۱/۲۵	۱/۲۵	۵	P.aeruginosa	۵	۵	۰/۶۲	۲/۵
S.aureus	۱/۲۵	۲/۵	۰/۶۲	۲/۵	E. coli	۵	۵	۲/۵	۲/۵
M.luteus	۱/۲۵	۲/۵	۰/۶۲	۱/۲۵	S. typhi	۱/۲۵	۱/۲۵	۵	۲۰
S. pyogenes	۲/۵	۲/۵	۵	۵	Sh. boydii	۲/۵	۲/۵	۵	۵

فعالیت ضد رادیکالی اسانس (درصد مهار DPPH):

مقادیر مهار رادیکال‌های آزاد DPPH توسط غلظت‌های مختلف و میزان $IC_{۵۰}$ اسانس پوست و برگ دارابی در جدول ۳ آورده شده است. از اسید آسکوربیک به‌عنوان کنترل استاندارد استفاده گردید. با افزایش غلظت اسانس، میزان مهار رادیکال‌های آزاد افزایش یافت. اسانس برگ $IC_{۵۰}$ بیشتری در مقایسه با پوست نشان داد. بین میزان $IC_{۵۰}$ اسانس دارابی و اسید آسکوربیک اختلاف معنی‌داری مشاهده شد.

جدول (۳): درصد بازدارندگی DPPH و ۵۰ IC غلظت هایمختلف اسانس دارابی

نمونه گیاهی		درصد بازدارندگی DPPH (میکروگرم بر میلی لیتر)					IC ۵۰
		۲	۴	۶	۸	۱۰	
پوست	٪DPPH	۸/۰۲	۱۹/۴۱	۲۶/۲۷	۲۹/۹۱	۳۳/۸۶	a۱/۲۵
برگ	٪DPPH	۱۲/۷۲	۱۴/۵۸	۱۷/۱۵	۲۹/۳۳	۳۶/۷۳	b۰/۷۹
اسید آسکوربیک	٪DPPH	۲۵/۵۸	۴۹/۰۲	۵۶/۵۱	۷۹/۸۵	۹۲/۰۴	c۰/۳۹

بحث و نتیجه‌گیری

در حال حاضر نیازی مبرم برای شناسایی و معرفی گیاهان جدید و مؤثر در تولید آنتی‌بیوتیک‌های طبیعی با پتانسیل بالای زیستی و اثرات جانبی کم وجود دارد (۲۵). اسانس‌ها ترکیبات فنلی معطری هستند که دارای فعالیت ضد میکروبی گسترده‌ای در برابر طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها ازجمله باکتری‌های گرم مثبت، گرم منفی و قارچ‌ها می‌باشند.

در حضور اسانس پوست و برگ دارابی، باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی حساسیت بیشتری را نشان دادند. دلایل حساسیت ذکر شده احتمالاً به عواملی ازجمله، حضور لایه لیپو پلی ساکاریدی در گرم منفی‌ها به‌عنوان یک مانع مؤثر برای ورود روغن‌های فرار با خاصیت هیدروفوب به داخل باکتری و مهار تنفس میکروبها توسط اسانس مرتبط می‌باشد (۲۶). تفاوت حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی بین باکتری‌های گرم مثبت با هم و همچنین گرم منفی می‌توان به عواملی ازجمله نوع استرین باکتری، میزان وحشی بودن، جهش‌های ایجاد شده در باکتری، مقاومت باکتریها در برابر متابولیت‌ها و عوامل آزمایشگاهی نسبت داد (۲۷)

گونزالس و همکاران (۲۸)، اثر ضد باکتریایی اسانس میوه گونه‌های مرکبات شامل *C.limon*، *C.paradisi*، *C.aurantium* و *C.grandis* بر روی باکتری‌های *اشریشیا کلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سودوموناس آئروژینوزا* گزارش کردند. بر اساس نتایج این گروه فقط باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* حساسیت نشان داد. اندازه بازدارندگی اسانس پوست *C.grandis* روی باکتری *اشریشیا کلی* برابر با ۱۳/۵ میلی‌متر و حداقل غلظت کشندگی برابر با ۴/۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش گردید (۲۹)، که مشابهت نزدیکی با نتایج ما داشت. از طرف دیگر فعالیت ضد میکروبی اسانس پوست گونه ذکر شده بر روی باکتری‌های *باسیلوس سوبتیلیس*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی* گزارش گردید (۳۰). فاکتورهایی ازجمله نوع استرین باکتریایی، نوع ژنوتیپ گیاه، زمان و مکان جمع‌آوری نمونه‌ها، نوع حلال و روش‌های ضدمیکروبی بر میزان اثر اسانس روی رشد باکتری‌ها مؤثر می‌باشند.

یوپادهیای و همکاران (۳۱)، فعالیت ضد میکروبی اسانس برگ *Citrus lemon* را بر روی باکتری‌های گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس*، *میکروکوکوس لوتئوس* و *باسیلوس سرئوس* و باکتری گرم منفی *اشریشیا کلی* گزارش کردند. نتایج این گروه مشابه تحقیق ما بیش‌ترین هاله بازدارندگی را بر روی باکتری *باسیلوس سرئوس* داشت. اسریسوخ و همکاران (۳۲)، اثر ضد باکتریایی اسانس پوست و برگ گونه *Citrus hystrix* بر روی پاتوژنهای دستگاه تنفسی ازجمله *استافیلوکوکوس اورئوس* و جعفری و همکاران (۳۳)، اثرات ضد میکروبی اسانس *Citrus aurantifolia* بر روی باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* گزارش کردند. اسانس پوست *C.paradisi* خاصیت ضد میکروبی علیه باکتری‌های *باسیلوس سرئوس*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی* نشان داد. مشابه تحقیق حاضر باکتری *باسیلوس سرئوس* حساسیت بیشتری در مقایسه با باکتری‌های دیگر داشت (۲۱). عواملی ازجمله حساسیت باکتری، شرایط آزمایش، ویژگی‌های متفاوت فیزیکی و شیمیایی اسانس سبب تفاوت در گزارشات حاصل از اثر اسانس بر روی رشد میکروارگانیسم‌ها می‌شوند (۳۴).

اسانس پوست *C.garndis* به‌دلیل وجود ترکیبات اسید کافئیک، کوماریک اسید، نومیلین و لیمونین دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی می‌باشد (۱۵). در نتایج تحقیق حاضر اسانس برگ بیشترین میزان IC_{50} را نشان داد. بر اساس این گزارشات می‌توان نتیجه گرفت که اسانس دارابی دارای ترکیبات با خواص ضداکسیدانی می‌باشد. سارو و همکاران (۳۵)، خواص آنتی‌اکسیدانی اسانس برگ‌های پیر و جوان،گل و پوست گونه *C.aurantium* را بررسی کردند. بر اساس نتایج این گروه اسانس برگ پیر به‌دلیل حضور ترکیبات آلفاترپینن، آلفاترپینولن و ژرانیول حداکثر درصد مهاری رادیکال آزاد (۵۳/۹۸ درصد) را نشان داد. چوی و همکاران (۳۶)، با بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی اسانس ۳۴ گونه از مرکبات، میزان درصد مهار DPPH آن‌ها را بین ۱۷/۷ تا ۶۴ درصد گزارش کردند، که با نتایج تحقیق ما مشابهت داشت. کمال و همکاران (۱۹)، درصد مهار رادیکال آزاد اسانس پوست *C.reticula*، *C.paradisi*، *C.sinensis* به ترتیب ۲۴/۰۸، ۱۸/۴۷، ۱۴/۰۵ درصد گزارش کردند. در مطالعه‌ای میزان IC_{50} پوست اسانس *C.medica* L.، بین ۰/۱۵۶-۰/۱۷۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش شد (۳۷)، که کم‌تر از میزان IC ۵۰ نتایج تحقیق حاضر بود. عواملی ازجمله شرایط جغرافیایی منطقه، شرایط آب و هوایی، نوع ژنوتیپ و گونه می‌توانند بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدان تأثیرگذار باشند (۳۸).

بر اساس نتایج به دست آمده از این تحقیق علمی و تجربی به‌دلیل وجود پتانسیل خاصیت ضدمیکروبی و ضد اکسیدانی اسانس دارابی، بعد از تحقیقات کاربردی و فراوری ترکیبات با خاصیت ضدمیکروبی می‌توان اسانس این گیاه دارویی را در صنعت داروسازی و پزشکی جهت تولید آنتی بیوتیک ها و داروهای ضدمیکروبی پیشنهاد کرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از اساتید محترم گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشـاورزی، بوعلی سینا همدان و مسئول آزمایشگاه جهت همکاری و مشاوره در این کار تحقیقی و علمی تشکر ویژه دارند.

References:

1. Singh K, Tiwari V, Prajapat R. Study of antimicrobial activity of medicinal plant against various multiple drug resistance pathogens and their molecular characterization and its bioinformatics analysis of antibiotic gen from genomic database with degenerate primer prediction. Int J Biol Tech 2010; 1 (2): 15-9.
2. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. Int J Food Microbiol 2004; 94: 223-53.
3. Adedeji GB, Fagade OE, Oyelade AA. Prevalence of Pseudomonas aeruginosa in Clinical Samples and its sensitivity to Citrus Extract. Afr J Biomed Res 2007; 2 (10):183-7.
4. Aibinu I, Adenipekun T, Adelowotan T, Ogunsanya T, Odugbemi T. Evaluation of the antimicrobial properties of different parts of Citrus aurantifolia (Lime fruit) as used locally. Afr J Trad 2007; 4:185-90.
5. Teixeira da Silva JA. Mining the essential oils of the Anthemideae. Afr J Biotechnol 2004; 3 (12): 706-20.
6. Ayoola GA, Johnson OO, Adelowotan T, Aibin IE, Adenipekun E, Odugbemi TO. Evaluation of the chemical constituents and the antimicrobial activity of the volatile oil of Citrus reticulata fruit (Tangerine fruit peel) from South West Nigeria. Afr J Biotechnol 2008; 7 (13): 2227-31.
7. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils – A review. Food Chem Toxicol 2008; 46: 446-75.
8. Kalemba D, Kunicka A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. Curr Med Chem 2003; 10: 813-29.
9. Samy RP, Gopalakrishnakone P. Therapeutic potential of plants and antimicrobials for drug discovery. Oxford University Press; 2008. P. 1-12.
10. Hounsome N, Hounsome B, Tomos D, Jones GE. Plant metabolites and nutritional quality of vegetables. J Food Sci 2008; 73 (4): R48-65.
11. Bairagi GB, Kabra AO, Mandade R.J. Anthelmintic Activity of Citrus medica L. leaves in Indian Adult Earthworm. Int J Pharmtech Res 2011; 3 (2): 664-7.
12. Ghasemi K, Ghasemi Y, Ebrahimzadeh MA. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of 13 citrus species peels and tissues. Pak J Pharm Sci 2009; 22: 277-81.
13. Kanaze FI, Termentzi A, Gabrieli C, Niopas I, Georgarakis M, Kokkalou E. The phytochemical analysis and antioxidant activity assessment of orange peel (Citrus sinensis) cultivated in Greece-Crete indicates a new commercial source of hesperidin. Biomed Chromatogr 2008; 23:239-49
14. Sharma N, Tripathi A. Effects of Citrus sinensis (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of Aspergillus Niger (L.) Van Tieghem. Microbiol Res 2008; 163(3):337-44.
15. Mokbel MS, Suganuma T. Antioxidant and antimicrobial activities of the methanol extracts from pummelo (Citrus grandis Osbeck) fruit albedo tissues. Eur Food Res Technol 2006; 224(1):39-47.
16. Kabra AO, Bairagi GB, Mahamuni AS, Wanare RS. In Vitro antimicrobial activity and phytochemical analysis of the peels of Citrus medica L. Int J Res Pharm Biomed Sci 2012; 3 (1): 34-7.
17. Alamhulu M, Nazeri S. The in vitro antibacterial activity of different organs hydroalcoholic extract of Dendrostellera lesserti. J Plant Res (Iranian Journal of Biology) 2016; 29 (3): 534-42.
18. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods- a review. Int J Food Microbiol 2004; 94: 223-53.

19. Kamal GM, Ashraf MY, Hossein A, Shahzadi A, Ghughtai IC. Amtioxidant potential of peel essential oil of three Pakistani citrus species: Citrus reticulate, Citrus sinensis and Citrus paradise. Pak J Bot 2013; 45(4): 1449-54.
20. Alamhulu M, Nazeri S. Assessment of the antioxidant and antibacterial effects of stem and leaf alcoholic extracts of Dendrostellera lesserti. Journal of microbial world 2015; 7(4): 289-98.
21. Okunowo WO, Oyedeji O, Afolabi LO, Matanmi E. Essential Oil of Grape Fruit (Citrus paradisi) Peels and Its Antimicrobial Activities. Am J Plant Sci 2013; 4:1-9.
22. Sokovic M, Marin PD, Brkic D, Griensven LJLD. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of ten aromatic plants against Human pathogenic bacteria. Food 2007;1(2):220-6.
23. Stojicevic SS, Stanisiavljevic IT, Velickovic DT, Veljkovic VB, Lazic ML. Comparative screening of the anti-oxidant and antimicrobial activities of Sempervivum marmoreum L. extracts obtained by various extraction techniques. J Serb Chem Soc 2008; 73(6): 597-60.
24. Sahin F, Gulluce M, Daferera D, Sokmen A, Sokmen M, Polissiou M. Biological activities of the essential oils and methanol extract of Origanum vulgare ssp. vulgare in the Eastern Anatolia region of Turkey. Food Control 2004; 15(7): 549-57.
25. Sharma B, Kumar P. Extraction and pharmacological evaluation of some extracts of Tridax procumbens and Capparis deciduas. Int J Appl Res Nat Prod 2009; 1 (4): 5-12.
26. Delaquis PJ, Stanich K, Girard B, Mazza G. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. Int J Food Microbiol 2002; 74: 101-9.
27. Walsh S E J Y, Maillard AD, Russel CE, Catrenich DL. Activity and mechanism of action of selected biocidal agents on Gram - positive and negative bacteria. J Appl Microbiol 2003; 94: 240-7.
28. Gonzalez de CN, Sánchez F, Quintero A. Chemotaxonomic Value of Essential Oil Compounds in Citrus Species. Acta Hort 2002; 576:49-51.
29. Oh HJ, Ahn HM, Kim SS, Yun PY, Riu KZ. Composition and Antimicrobial Activities of Essential Oils in the Peel of Citrus Fruits. Appl Biol Chem 2007; 50(3): 148-54.
30. Tao NG, Liu YJ. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil from the Peel of Shatian Pummelo (Citrus Grandis Osbeck). Int J Food Prop 2012; 15:709-16.
31. Upadhyay RK, Dwivedi P, Ahmad Sh. Screening of antibacterial activity of Six plant essential oils against pathogenic bacterial strain. Asian J Med Sci 2010; 2(3): 152-8.
32. Srisukh V, Tribuddharat Ch, Nukoolkarn V, Bunyapraphatsara N, Chokephaibulkit K, Srifuengfung S. Antibacterial activity of essential oils from Citrus hystrix (makrut lime) against respiratory tract pathogens. Science Asia 2012; 38:212–7.
33. Jafari S, Esfahani S, Fazeli MR, jamalifar H, Ardekani MR, Khanavi M. Antimicrobial activity of lime oil agaisnt food-borne pathogens isolated from cream-filled cakes and pastries. Int J Biol Chem 2011; 5 (4): 258-26.
34. Badar N, Arshad M, Farooq U. Characteristics of Anethum graveolens (Umbelliferae) seed oil: Extraction, composition and antimicrobial activity. Int J Agric Biol 2008; 10:329-32
35. Sarrou E, Chatzopoulou P, Theriou DK, Therios I. Volatile Constituents and Antioxidant Activity of Peel, Flowers and Leaf Oils of Citrus aurantium L. Growing in Greece. Molecules 2013; 18:10639-47.
36. Choi HS, Song HS, Ukeda H, Sawamura M. Radical-scavenging activities of citrus essential oils and their components: Detection using 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. J Agric Food Chem 2000; 48: 4156–61.

37. Menichini F, Tundis R, Bonesi M, Cindio B, Loizzo MR, Conforti F, et al. Chemical composition and bioactivity of Citrus medica L. cv. Diamante essential oil obtained by hydrodistillation, cold-pressing and supercritical carbon dioxide extraction. Nat Prod Res 2011; 25(8):789-99.

38. Shojaemehr M, Alamholo M. Investigation of human pathogenic bacteria susceptible against essential oil of Citrus medica and antioxidant activity in vitro J Herb Drug 2019; 10 (1): 47-52.

Original Article

EVALUATION OF ANTIBACTERIAL AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF *CITRUS GRANDIS* ESSENTIAL OIL ON STANDARD BACTERIAL STRAINS

Mohadeseh Shojaemehr[1], Mostafa Alamholo[*2]

Received: 21 February, 2021; Accepted: 20 November, 2021

Abstract

Background & Aims: The natural compounds have received more attention due to their lower side effects and better biodegradation compared to antibiotics. The purpose of this study was to investigate the antibacterial and antioxidant effects of leaf and skin essential oil of *Citrus Grandis* on some human pathogenic bacteria.

Materials & Methods: The leaf and skin of *Citrus Grandis* were collected under the supervision of Citrus Research Center experts from the northern province of Iran (Ramsar, Mazandaran). Essential oil extraction was performed by a Clevenger apparatus. In this empirical study, antibacterial activity, minimum inhibitory and bactericidal concentration were determined by agar well diffusion and microdilution broth, respectively. Also, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl reagent was used for the antiradical activity according to free radical inhibition percentage.

Results: The leaf essential oil showed the highest inhibitory effect on *Bacillus cereus* (32.5 ± 0.5 mm). The leaf essential oil of *Citrus Grandis* showed a better inhibitory effect compared to the skin essential oil. Minimum inhibitory concentration of leaf essential oil on *Bacillus cereus* of 0.62 µg mL^{-} and minimum inhibitory concentration of skin essential oil on *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* and *Pseudomonas aureus* bacteria of 0.62 µg mL^{-} were obtained. Free radical scavenging increased by increasing the essential oil concentration. The essential oil of leaf showed the highest IC_{50} value**.**

***Conclusion*:** Based on the findings, essential oil of *Citrus Grandis* demonstrated strong antibacterial and antioxidant properties. *Citrus Grandis* essential oil compounds can be processed for antibiotic production and synthesis of antimicrobial drugs in medical and pharmaceutical sector.

Keywords: *Citrus grandis*, Essential oil, Antiradical, Antibacterial

Address: Institute of Science and Modern Technology, Rojava University, Qamishlo, Syria
Tel: +963938986524
Email: mostafaalamholo@yahoo.com

SOURCE: STUD MED SCI 2021: 32(4): 251 ISSN: 2717-008X

[1] *MSc, Department of Plant Biotechnology, Faculty of Agriculture, Bu Ali Sina University, Hamadan, Iran*

[2] *Department of Biotechnology, Institute of Science and Modern Technology, Rojava University, Qamishlo, Syria (Corresponding Author)*