



Scan online to view this article

Inhibitory effects of ozonated grape seed oil on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*

Mona Mokhtarnejad¹, Mahmoud Pooryousef Miandoab^{1*}, Shahram Armeideh²

1- Department of Biology, Faculty of Science, Urmia branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran.

2- Department of Agroecology, Urmia Branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran.

Abstract

Aim and Background: Due to the increasing resistance of pathogenic bacteria to common and newborn antibiotics, and effects of indiscriminate use of antibiotics on some organs of the body. Researchers are trying to find alternative drugs with plants, organic and physical sources. The aim of this study was to evaluate the antibacterial effect of ozonated grape seed oil on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*.

Material and Methods: Grape seed oil by Soxhlet was extracted and ozonated, then the effect of ozonated grape seed oil using inhibitory growth diameter size and minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration indices on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* using analysis of variance (ANOVA) was evaluated and determined.

Results: Comparison of the diameter of the growth inhibitory zone with different treatments indicated that ozonated oil and ozonated water had high inhibitory effects ($P < 0.05$). The turbidity and clarity of ozone oil in microplate wells showed that the minimum inhibitory concentration ($0.128 \text{ mg. ml}^{-1}$) and the minimum bactericidal concentration (ineffective) on bacteria

Conclusion: According to the obtained results, grape seed oil can be used as an effective natural substitute for controlling these pathogens, especially *S. aureus* with proper safety.

Key words: Ozonated grape seed oil, Ozone, MIC, MBC

Corresponding author:

Department of Agroecology, Urmia Branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran

Email: Pooryousefm@yahoo.com



برای مشاهده این مقاله به صورت
آنلاین اسکن کنید

بررسی اثر ضد باکتریایی روغن هسته انگور ازونه روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوز مونا مختارنژاد^۱، محمود پوریوسف میاندوآب^{۱*}، شهرام آرمیده^۲

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، واحد ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران

۲- گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ایران

چکیده

سابقه و هدف: به دلیل مقاومت باکتری های بیماری زا به آنتی بیوتیک های رایج و اثرهای مصرف بی رویه آنتی بیوتیک ها روی ارگان های بدن محققین در پی یافتن عوامل ضد میکروبی با منشأ گیاهی، ارگانیک و عوامل فیزیکی، به عنوان داروهای جایگزین هستند. هدف از این مطالعه بررسی اثر ضد باکتریایی روغن هسته انگور ازونه روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوز است.

مواد و روش ها: روغن هسته انگور به وسیله سوکسله استخراج و ازونه گردید، سپس قدرت تأثیر روغن هسته انگور ازونه با استفاده از شاخص های اندازه قطر هاله مهار و حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوز با استفاده از روش تجزیه واریانس آنوا ارزیابی و تعیین گردید.

یافته ها: مقایسه اندازه قطر هاله مهار و رشد به وسیله تیمارهای مختلف نشان داد روغن ازونه و آب ازونه دارای مهارکنندگی بالایی هستند ($P < 0.05$). کدورت و شفافیت حاصل از روغن ازونه در چاهک های میکروپلیت و میزان حداقل غلظت مهارکنندگی (0.128 میلی گرم بر میلی لیتر) و حداقل غلظت کشندگی (غیرمؤثر) روی باکتری ها را نشان داد.

نتیجه گیری: طبق نتایج به دست آمده روغن هسته انگور ازونه را می توان به عنوان جایگزینی طبیعی برای کنترل این پاتوژن ها به ویژه استافیلوکوکوس اورئوس به کار برد.

واژه های کلیدی: روغن هسته انگور ازونه، ازون، حداقل غلظت مهارکنندگی، حداقل غلظت کشندگی

مقدمه

علی رغم اثرهای درمانی دلخواه داروهای صنعتی، به دلیل عوارض جانبی ناخواسته آنها، روز به روز گرایش مردم به استفاده از این داروها کاسته شده و در عوض گرایش به مصرف داروهایی با منشأ طبیعی افزایش

یافته است. امروزه نیز استفاده از روغن های گیاهی حاوی گاز ازون به دلیل خواص ضد میکروبی و نداشتن اثرهای سوء بر محیط و بدن انسان مورد توجه قرار گرفته است (۱). از طرفی باکتری های بیماری زاى انسانی نظیر استافیلوکوکوس اورئوس (*Staphylococcus aureus*) و سودوموناس آئروژینوز (*Pseudomonas aeruginosa*) نیز عامل مهم ایجاد طیف وسیعی از عفونت ها هستند (۳،۲). درخت انگور (*Vitis vinifera* L.) از تیره ویتاسه است (۴). روغن هسته انگور دارای ارزش تغذیه ای بالایی است که می توان آن را به محتوای بالای اسیدهای چرب غیراشباع و وجود انواع ویتامین ها، توکوفرول، پلی فنول ها و آنتی اکسیدان ها نسبت داد. میزان روغن هسته انگور از ۱۱/۶ تا ۱۹/۶ درصد متغیر است. این روغن غنی از

نویسنده مسئول:

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، واحد ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی،

ارومیه، ایران

پست الکترونیکی: Pooryousefmi@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۰/۱۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۷/۲۳

اسیدهای اولئیک و لینولئیک بوده و به ترتیب ۱۷/۸ تا ۲۶/۵ و ۶۰/۱ تا ۷۰/۱ درصد است. درجه غیر اشباع بودن آن بالاتر از ۸۶ درصد است. این روغن همچنین منبع طبیعی ویتامین E است (۵). ساختار ازون چندشکلی بوده و دارای ویژگی‌های منحصر به فردی است. این خصوصیت‌های تعریف شده، همان‌طور که در روش‌های کلینیکی مورد استفاده قرار می‌گیرند در سیستم‌های زیستی نیز به کار برده می‌شوند. ازون مکانیسم‌های باکتری‌کشی، قارچ‌کشی و ویروس‌کشی را بروز می‌دهد که همین امر سبب می‌گردد از آن به عنوان یک انتخاب درمانی در کنار روش‌های دیگر استفاده گردد (۶). در غلظت‌های بالا ازون دارای قابلیت میکروب‌کشی و تخریب اکسیداتیو است. قدرت اکسیداتیو ثابت کرده است که در از بین بردن ویروس‌ها در چربی‌های احاطه شده مثل اپسیتین، تبخال، ویروس سیتومگال و ویروس‌هایی که موجب ابتلا به هیپاتیت می‌شود مؤثر است. یک مطالعه جدید نشان می‌دهد که درمان با ازون برای از بین بردن ایدز در شرایط آزمایشگاهی مؤثر است (۷). آب ازونه می‌تواند اثر ضدباکتریایی خود را برای حدود ۳۰ دقیقه حفظ کند، در حالی که روغن ازونه می‌تواند توانایی استریلیزاسیون خود را به طور مداوم حفظ کند (۸). هنگامی که ازون از طریق تزریق به روغن هسته انگور دائم برای هفته‌ها حباب بزند، روغن شروع به تغییر می‌نماید. ابتدا رنگ خود را از دست می‌دهد، سپس کف می‌کند و در نهایت به ژل سفتی تبدیل می‌شود. اگر این ژل در ۴۰ درجه فارنهایت در یخچال نگهداری شود، کارایی خود را برای بیش از ده سال حفظ می‌کند. استفاده از این ژل روی پوست کاربردهای زیادی هم چون بریدگی، خراش و سوختگی، گزش حشرات، اگزما، زرد زخم، تبخال و غیره دارد. روغن ازونه ۹۵ درصد مانند گاز ازون فعال است (۹). لذا در این مطالعه اثرهای روغن هسته انگور خالص و ازونه، همچنین آب ازونه در رشد باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سودوموناس آئروژینوزا* با استفاده از شاخص اندازه قطر هاله مهار و آزمایش تعیین حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

بررسی حاضر در آزمایشگاه میکروبیولوژی گروه زیست-شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه و در تابستان سال ۱۳۹۷ انجام گرفت. باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC:25923) و *سودوموناس آئروژینوزا* (ATCC:27852) از واحد فناوری زیست پویش فردا مستقر در مرکز رشد دانشگاه آزاد اسلامی تهیه گردید. باکتری‌ها در محیط مولر هینتون آگار ساخت کشور ایتالیا، تهیه شده از شرکت جهان کیمیا کشت داده شد و برای آماده‌سازی و کشت مجدد به یخچال آزمایشگاه میکروب‌شناسی منتقل گردیدند. باکتری‌ها در محیط کشت نوترینت آگار مورد کشت مجدد و تازه قرار گرفتند تا این‌که پرگنه‌های ایزوله یا تک به دست آید. پلیت‌ها یک شب در 37 ± 3 درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند. سپس ۴ یا ۵ پرگنه ایزوله شده را با آنس حلقوی استریل به یک لوله آزمایش استریل حاوی ۵ میلی‌لیتر سالین فیزیولوژیکی استریل منتقل نموده و به خوبی با ورتکس مخلوط گردیدند. در یک لوله آزمایش دیگر ۵ میلی‌لیتر از محلول نیم مک فارلند ریخته شد. جهت تهیه محلول نیم‌مک فارلند ۰/۵ میلی‌لیتر کلرور باریم ۰/۴۸ مول بر لیتر به ۵/۹۹ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۰/۱۸ مول بر لیتر اضافه گردید و با هم زدن مداوم سوسپانسیون به دست آمد. سپس کدورت سالین محتوی پرگنه با کدورت لوله نیم مک فارلند به صورت چشمی و در زیر نور چراغ، مطالعه و در مقابل یک صفحه سفید با خطوط سیاه مقایسه گردید. اگر کدورت سالین کم‌تر از نیم‌مک فارلند بود، پرگنه افزوده و تکان داده شد ولی اگر کدورت سالین بیش‌تر بود، سالین سترون افزوده و در نهایت کدورت تنظیم گردید. سپس کدورت سالین با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۲۵ نانومتر کنترل شد که جذب نوری یا OD باید بین ۰/۰۸ تا ۰/۱ باشد. این کدورت معادل $10^8 \times 1/5$ cfu/ml باکتری است.

استخراج و ازونه کردن روغن هسته انگور

هسته انگور مورد استفاده از انگور سیاه دانه‌دار (واریته شانی) جداسازی گردید. هسته‌های انگور به مدت ۲ ساعت در دمای ۵۰ درجه سلسیوس خشک شدند تا رطوبت هسته‌ها به ۶-۷ درصد برسد، سپس روغن هسته انگور در محیط آزمایشگاه با استفاده از دستگاه سوکسله و حلال پترولیوم اتر استخراج شد. حلال موجود توسط دستگاه

تبخیر کننده دوار تحت خلاء و در دمای ۶۵ درجه سلسیوس از آن جدا شد و به منظور جداسازی کامل حلال باقی مانده، روغن حاصله به مدت ۵ ساعت در آون خلاء ۶۵ درجه سلسیوس قرار داده شد. روغن هسته انگور به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۱۵ درجه سلسیوس ازونه گردید. میزان ورودی اکسیژن دستگاه ۱ لیتر و خروجی ازون آن ۱ گرم بر ساعت تنظیم شد.

آزمایش انتشار روی دیسک

برای انجام آزمایش انتشار روی دیسک ابتدا کشت ۲۴ ساعته از هر یک از باکتری‌های مورد آزمون که کمابیش حاوی 10^6 باکتری در هر میلی لیتر بودند با استفاده از سوآپ سترون روی محیط کشت مولر هینتون آگار تلقیح شده، سپس دیسک‌های بلانک سترون به قطر ۶ میلی متر که با ۱۰ میکرولیتر از روغن هسته انگور ازونه ۷۲ ساعته و همچنین روغن هسته انگور خالص روی محیط کشت مولر هینتون آگار تلقیح شده، گذاشته شد. به طوری که هر کدام از دیسک‌ها حاوی ۱ میلی گرم از ترکیب‌های مورد مطالعه بودند. برای کنترل مثبت از دیسک آنتی بیوتیک سپیروفلوکساسین ساخت کشور ایران، تهیه شده از شرکت پادتن طب و برای کنترل منفی از دیسک‌های بلانک سترون استفاده گردید. سپس پلیت‌ها در 37 ± 2 درجه سلسیوس به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت به طور جداگانه گرمخانه گذاری شدند که بعد از اتمام زمان گرمخانه گذاری قطر هاله عدم رشد تشکیل شده در اطراف دیسک‌های مورد آزمایش در زیر نور بررسی و با استفاده از خط کش اندازه گیری کولیس، به صورت میلی متر برای انجام کارهای آماری گزارش شد.

رقیق سازی روغن‌ها

برای رقیق سازی روغن خالص از محلول دی متیل سولفو اکسید (DMSO) ۱۰ درصد استفاده گردید. ۰/۱۲۸ گرم از روغن اول وزن شده و به داخل لوله آزمایش اول ریخته شد، سپس ۱۰۰۰ میکرولیتر محلول دی متیل سولفو اکسید به لوله اول وارد شد. به ۷ لوله باقی مانده نیز ۵۰۰ میکرولیتر محلول دی متیل سولفو اکسید ریخته شد. لوله اول با دستگاه ورتکس به خوبی مخلوط گردید. از لوله اول با سمپلر ۵۰۰ میکرولیتر برداشته و به لوله دوم وارد گردید و لوله دوم را به خوبی مخلوط کرده و تا آخرین لوله

همین رویه ادامه داده شد. هنگامی که به لوله هشتم رسید، ۵۰۰ میکرولیتر از آن دور ریخته شد. ۰/۱۲۸ گرم از روغن ازونه نیز به همراه ۱۰۰۰ میکرولیتر محلول دی متیل سولفو اکسید با همین روش رقیق گردید و در انتهای لوله هشتم ۵۰۰ میکرولیتر آن دور ریخته شد. رقیق سازی غلظت روغن‌ها از ۰/۱۲۸ تا ۰/۰۰۱ گرم انجام شد.

تزریق رقت‌های تهیه شده از باکتری‌های مورد

مطالعه و محیط کشت به پلیت ۹۶ خانه‌ای

برای تزریق رقت‌های تهیه شده از باکتری و محیط کشت به پلیت ۹۶ خانه‌ای، محیط کشت مولر هینتون براث و سوسپانسیون از باکتری‌ها به طور جداگانه تهیه گردید. سپس به میزان ۱۶۰ میکرولیتر محیط مولر هینتون براث، ۲۰ میکرولیتر باکتری، ۲۰ میکرولیتر روغن با سمپلر به داخل چاهک‌های پلیت تزریق گردید. این آزمایش برای روغن هسته انگور خالص، روغن هسته انگور ازونه و به صورت جداگانه در ۳ تکرار انجام گرفت. پلیت‌ها بعد از مخلوط شدن در 37 ± 3 درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شدند.

بعد از ۲۴ ساعت پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای از انکوباتور خارج شده و مشاهده گردید. رشد یا عدم رشد باکتری و میزان کدورت ایجاد شده در داخل چاهک‌ها مورد بررسی قرار گرفت. مواد داخل هریک از چاهک‌ها روی پلیت حاوی محیط مولر هینتون آگار کشت سطحی داده شد. پلیت‌ها بعد از مخلوط شدن، در 37 ± 1 درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شدند. پس از ۲۴ ساعت میزان رشد باکتری‌ها جهت تعیین MIC و MBC ارزیابی شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

تجزیه و تحلیل آماری داده‌های حاصله با استفاده از نرم افزار IBM SPSS Statistics 22 انجام شد. همگنی واریانس داده‌ها با آزمون لون (Leven) بررسی گردید. برای داده‌های با توزیع نرمال با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه آنوا و آزمون تکمیلی توکی اختلاف میانگین قطر هاله عدم رشد مربوط به /استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا/ بررسی شد. لازم به ذکر است برای کاهش خطا، آزمایش‌ها در ۳ تکرار انجام

گرفت. در تمامی مراحل تجزیه و تحلیل، خطای مجاز برای رد فرض صفر (H_0)، ۵ درصد در نظر گرفته شد و نمودارها با استفاده از نرم افزار اکسل ۲۰۱۶ رسم گردید.

یافته‌ها

تست انتشار روی دیسک در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس پس از ۲۴ ساعت
تجزیه آماری حاصل از تأثیر تیمارهای روغن هسته انگور، روغن هسته انگور ازونه، آنتی بیوتیک سپیروفلوکساسین

به عنوان کنترل مثبت و آب به عنوان کنترل منفی در ایجاد هاله عدم رشد روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بعد از ۲۴ ساعت اختلاف معنی داری بین تیمارها مشاهده شد ($F_{(4,10)} = 516/100$ و $P = 0/001$) (جدول ۱). در این آزمایش تست لون بیش تر از آلفای مفروض ($0/05$) بوده و فرض همگنی واریانسها محقق گردیده است ($\text{Sig} = 0/364$)، لذا داده های این آزمایش نرمال بوده و آزمایش از دقت خوبی برخوردار است.

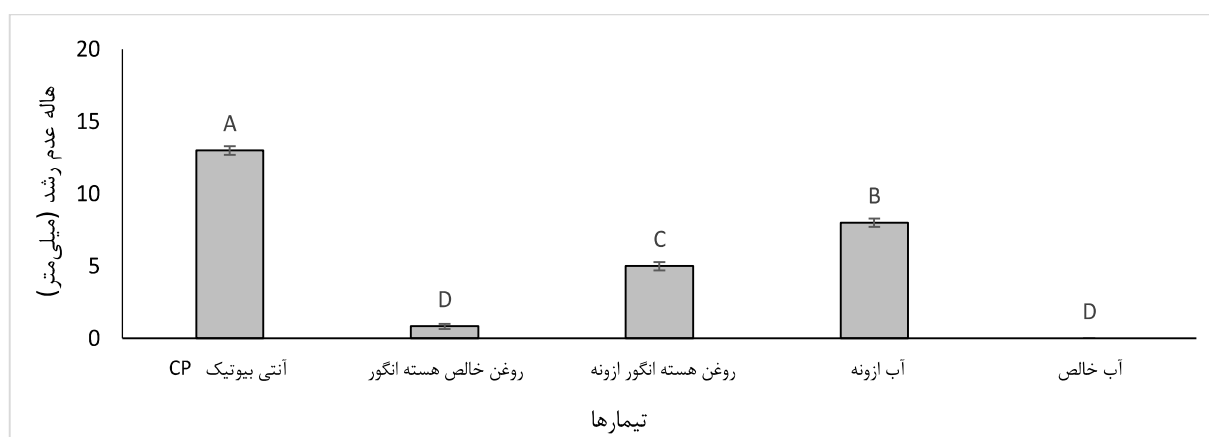
جدول ۱- تجزیه واریانس حاصل از تأثیر تیمارهای روغن هسته انگور، روغن هسته انگور ازونه، آنتی بیوتیک سپیروفلوکساسین به عنوان کنترل مثبت و آب به عنوان کنترل منفی در ایجاد هاله عدم رشد روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس پس از ۲۴ ساعت

منابع	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F	سطح احتمال
تیمار	۳۴۴/۰۶۷	۴	۸۶/۰۱۷	$516/100^*$	۰/۰۰۱
خطا	۱/۶۶۷	۱۰	۰/۱۶۷		
کل	۳۴۵/۷۳۳	۱۴			

* با احتمال ۹۵ درصد بین تیمارها اختلاف معنی داری وجود دارد.

مربوط به آنتی بیوتیک سپیروفلوکساسین و سپس آب ازونه است. بعد از آب ازونه، روغن هسته انگور ازونه بیش ترین هاله عدم رشد را ایجاد نمود (شکل ۱).

از مقایسه تأثیر تیمارهای مختلف روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بعد از ۲۴ ساعت، با استفاده از روش توکی در سطح احتمال ۹۵ درصد، بیش ترین هاله عدم رشد



شکل ۱- مقایسه میانگین ($\pm SE$) قطر هاله عدم رشد تیمارها روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس پس از ۲۴ ساعت، به وسیله آزمون توکی در سطح احتمال ۰/۰۵. ستون هایی که دارای حروف مشابه هستند اختلاف معنی داری ندارند.

عنوان کنترل مثبت، و آب به عنوان کنترل منفی در ایجاد هاله عدم رشد روی باکتری سودوموناس آئروژینوزا بعد از ۲۴ ساعت اختلاف معنی داری بین تیمارها مشاهده شد ($F_{(4,10)} = 524/645$ و $P = 0/001$) (جدول ۲). در این آزمایش تست لون

تست انتشار روی دیسک در باکتری سودوموناس آئروژینوزا پس از ۲۴ ساعت
تجزیه آماری حاصل از تأثیر تیمارهای روغن هسته انگور، روغن هسته انگور ازونه، آنتی بیوتیک سپیروفلوکساسین به-

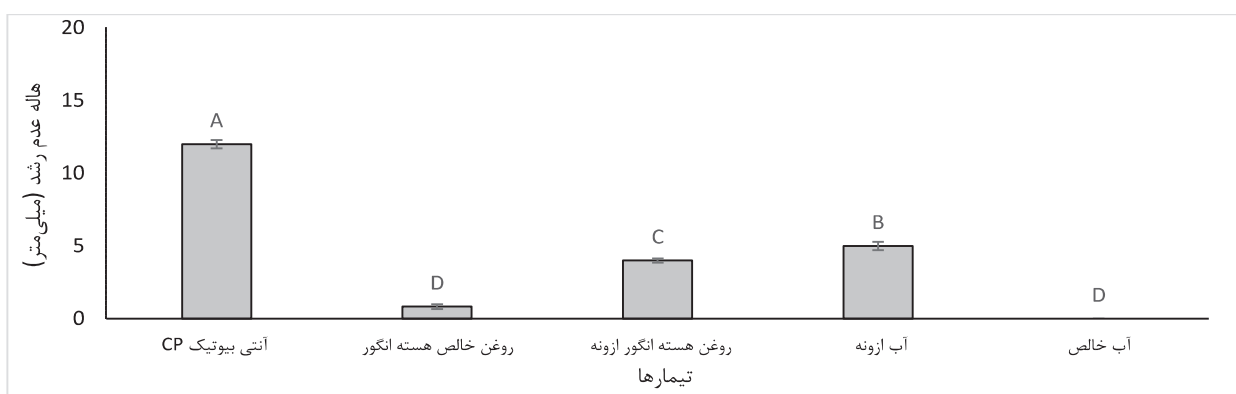
بیشتر از آلفای مفروض (۰/۰۵) بوده و فرض همگنی واریانس‌ها محقق گردیده است (Sig=۰/۱۲۸)، لذا داده‌های آزمایش نرمال بوده و آزمایش از دقت بیش‌تری برخوردار است.

جدول ۲- تجزیه واریانس حاصل از تأثیر تیمارهای روغن هسته انگور، روغن هسته انگور ازونه، آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین به‌عنوان کنترل مثبت، و آب به‌عنوان کنترل منفی در ایجاد هاله عدم رشد روی باکتری سودوموناس آئروژینوزا/ پس از ۲۴ ساعت

منابع	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F	سطح احتمال
تیمار	۲۷۱/۰۶۷	۴	۶۷/۷۶۷	۵۲۴/۶۴۵*	۰/۰۰۱
خطا	۱/۳۹۲	۱۰	۰/۱۲۹		
کل	۲۷۲/۳۵۸	۱۴			

* با احتمال ۹۵ درصد بین تیمارها اختلاف معنی‌داری وجود دارد.

در مقایسه تأثیر تیمارهای مختلف روی باکتری سودوموناس آئروژینوزا/ بعد از ۲۴ ساعت با استفاده از روش توکی در سطح احتمال ۹۵ درصد، بیش‌ترین هاله عدم رشد مربوط به آب ازونه، روغن هسته انگور ازونه بیش‌ترین هاله عدم رشد را ایجاد نمود (شکل ۲).



شکل ۲- مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد تیمارها روی باکتری سودوموناس آئروژینوزا/ پس از ۲۴ ساعت، به‌وسیله آزمون توکی در سطح احتمال ۰/۰۵. ستون‌هایی که دارای حروف مشابه هستند اختلاف معنی‌داری ندارند.

داده‌های آزمایش نرمال بوده و آزمایش از دقت بیش‌تری برخوردار در مقایسه تأثیر تیمارهای مختلف روی باکتری استافیلوکوکوس/ اورئوس بعد از ۴۸ ساعت با استفاده از روش توکی در سطح احتمال ۹۵ درصد، بیش‌ترین هاله عدم رشد مربوط به آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین و سپس آب ازونه است. بعد از آب ازونه، روغن هسته انگور ازونه بیش‌ترین هاله عدم رشد را ایجاد نمود (شکل ۳).

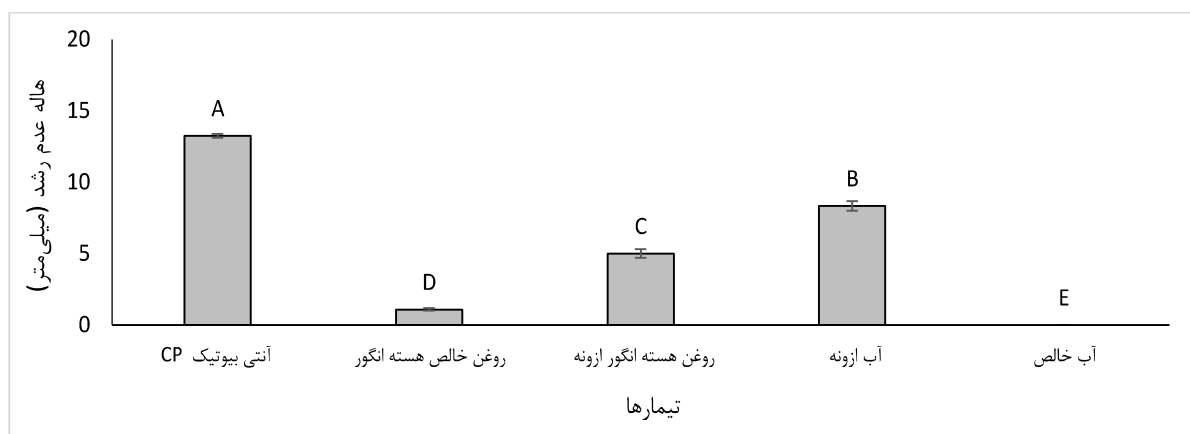
تست انتشار روی دیسک در باکتری استافیلوکوکوس/ اورئوس پس از ۴۸ ساعت

تجزیه آماری حاصل از تأثیر تیمارهای روغن هسته انگور، روغن هسته انگور ازونه، آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین به‌عنوان کنترل مثبت، و آب به‌عنوان کنترل منفی در ایجاد هاله عدم رشد روی باکتری استافیلوکوکوس/ اورئوس بعد از ۴۸ ساعت اختلاف معنی‌داری بین تیمارها مشاهده شد ($F_{(4, 10)} = ۶۶۴/۲۶۶$ و $P = ۰/۰۰۱$) (جدول ۳). در این آزمایش تست لون بیش‌تر از آلفای مفروض (۰/۰۵) بوده و فرض همگنی واریانس‌ها محقق گردیده است (Sig=۰/۵۸)، لذا

جدول ۳- تجزیه واریانس حاصل از تأثیر تیمارهای مختلف در ایجاد هاله عدم رشد روی باکتری استافیلوکوکوس/ اورئوس پس از ۴۸ ساعت

منابع	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F	سطح احتمال
تیمار	۳۵۴/۲۷۵	۴	۶۷/۷۶۷	۶۶۴/۲۶۶*	۰/۰۰۱
خطا	۱/۶۶۷	۱۰	۰/۱۲۹		
کل	۳۴۵/۷۳۳	۱۴			

* با احتمال ۹۵ درصد بین تیمارها اختلاف معنی‌داری وجود دارد.



شکل ۳- مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد تیمارها روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* پس از ۴۸ ساعت، به وسیله آزمون توکی در سطح احتمال ۰/۰۵. ستون هایی که دارای حروف مشابه هستند اختلاف معنی داری ندارند.

ساعت اختلاف معنی داری بین تیمارها مشاهده شد. (جدول ۴) $(P=0/001 و F_{(4,10)}=522/606)$. در این آزمایش تست لون بیش تر از آلفای مفروض (۰/۰۵) بوده و فرض همگنی واریانس ها محقق گردیده است (Sig= ۰/۶۷۸)، لذا داده های آزمایش نرمال بوده و آزمایش از دقت بیشتری برخوردار است.

تست انتشار روی دیسک در باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* پس از ۴۸ ساعت

تجزیه آماری حاصل از تأثیر تیمارهای روغن هسته انگور، روغن هسته انگور ازونه، آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین به- عنوان کنترل مثبت، و آب به عنوان کنترل منفی در ایجاد هاله عدم رشد روی باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* بعد از ۴۸

جدول ۴- تجزیه واریانس حاصل از تأثیر تیمارهای مختلف در ایجاد هاله عدم رشد روی باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* پس از ۴۸ ساعت

منابع	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F	سطح احتمال
تیمار	۲۸۷/۴۳۳	۴	۷۱/۸۵۸	۵۲۲/۶۰۶*	۰/۰۰۱
خطا	۱/۳۷۵	۱۰	۰/۱۳۸		
کل	۲۸۸/۸۰۸	۱۴			

* با احتمال ۹۵ درصد بین تیمارها اختلاف معنی داری وجود دارد.

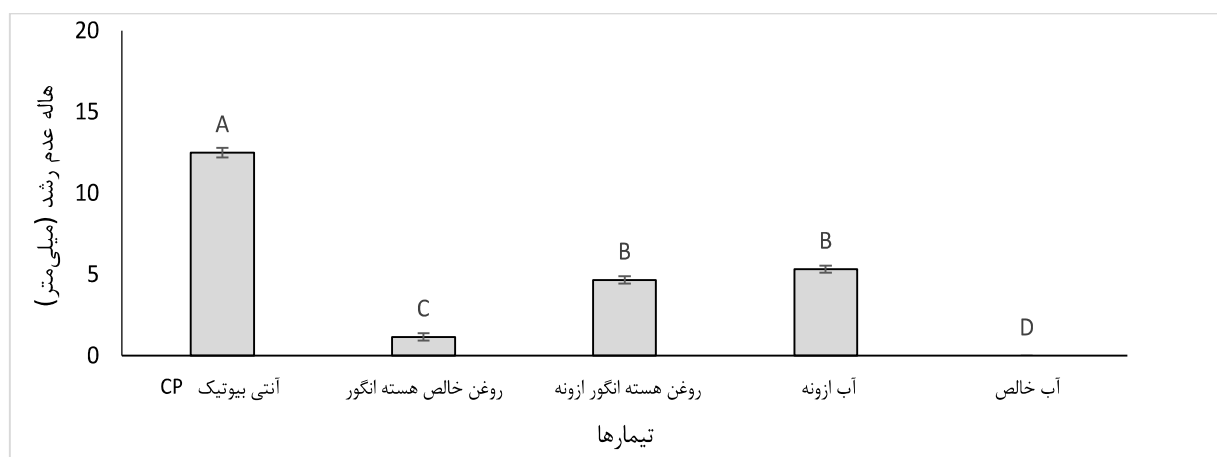
بحث

روغن های گیاهی به واسطه داشتن طیف وسیعی از ترکیب های زیستی فعال به عنوان یک منبع بالقوه با خواص ضد باکتریایی، مورد توجه ویژه هستند، زیرا روغن های گیاهی به علت داشتن منشاء طبیعی نسبت به داروهای شیمیایی دارای سازگاری بیشتری با ارگانیسم های زنده از جمله بدن انسان بوده و عوارض جانبی کمتری ایجاد می کنند (۱۰). در تحقیقی اثر ضد میکروبی روغن دانه انگور روی *سودوموناس آئروژینوزا*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیاکلی* و *کلبسیلا پنومونیه* جداسازی شده از عفونت مجاری ادراری بررسی و باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به میزان بیش تری نسبت به سایر

در مقایسه تأثیر تیمارهای مختلف روی باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* بعد از ۴۸ ساعت با استفاده از روش توکی در سطح احتمال ۹۵ درصد، بیش ترین هاله عدم رشد مربوط به آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین و سپس آب ازونه است. بعد از آب ازونه، روغن هسته انگور ازونه بیش ترین هاله عدم رشد را ایجاد نمود (شکل ۴).

میزان کشندگی و بازدارندگی تیمارها روی باکتری ها

نتایج مربوط به حداقل غلظت (گرم بر میکرولیتر) ممانعت کنندگی از رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) بین تیمارهای مورد مطالعه در مقابل باکتری های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سودوموناس آئروژینوزا* در جدول ۵ نشان داده شده است.



شکل ۴- مقایسه میانگین ($\pm$ SE) قطر هاله عدم رشد تیمارها روی باکتری سودوموناس آئروژینوزا پس از ۴۸ ساعت، به وسیله آزمون توکی در سطح احتمال ۰/۰۵. ستون هایی که دارای حروف مشابه هستند اختلاف معنی داری ندارند.

جدول ۵- میزان کشندگی و بازدارندگی تیمارهای باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس و سودومونای آئروژینوزا

MBC			MIC			تیمار
تکرار ۳	تکرار ۲	تکرار ۱	تکرار ۳	تکرار ۲	تکرار ۱	
NE	NE	NE	۰/۱۲۹	۰/۱۲۸	۰/۱۲۷	روغن خالص
۰/۰۶۵	۰/۰۶۴	۰/۰۶۳	۰/۱۲۹	۰/۱۲۸	۰/۱۲۷	روغن ازونه

NE= غیر مؤثر

به پاکسازی زخم از عفونت موجب تسریع ترمیم زخم می شود، گرچه ازون یک مولکول رادیکالی نیست اما بسیار واکنشگرتر از اکسیژن است. ازون با واکنش سریع، توانایی اکسید ترکیب های آلی و یا غیر آلی را دارد. بنابراین، ازون می تواند غشای پلاسمای همه میکروارگانیسم ها، از جمله باکتری ها، ویروس ها و قارچ ها را از بین ببرد و در نهایت این میکروارگانیسم ها را تکه تکه کند (۱۳، ۱۴). روغن هسته انگور غنی از پلی فنول ها و پروآنتوسیانیدین است. پلی فنول های رژیمی غیر قابل جذب و متابولیت های آنها بسته به ساختار شیمیایی و غلظتشان، می توانند به عنوان فعال کننده ها یا بازدارنده های رشد میکروبی عمل کنند. این متابولیت ها به طور انتخابی از رشد پاتوژن های مواد غذایی مانند لیستریا مونوسیتوژنز، سالمونلا تیفی موریوم، اشرشیا کلی و کامپیلوباکتر ژژونی جلوگیری می کنند و رشد باکتری های همزیست شامل تعدادی از پروبیوتیک ها را تحریک کرده، بنابراین فلور میکروبی را تحت تأثیر قرار می دهند. علاوه بر این، دارای خواص آنتی اکسیدانی بالقوه و اثرهای سینرژیستی در فعالیتهای ضد میکروبی در ترکیب با اسیدهای آلی (اسید مالیک، اسید تارتاریک، اسید بنزوئیک و غیره) هستند. طبق نتایج به دست آمده روغن

باکتری ها مهار گردید. در تحقیق حاضر نیز استافیلوکوکوس اورئوس به میزان بیش تری به روغن هسته انگور ازونه حساسیت نشان داد (۱۱). نتایج بررسی اثر مهاری روغن هسته انگور بر باکتری های مواد غذایی نشان داد که، روغن هسته انگور خالص غنی از ترکیب های پلی فنلی بوده و دارای خواص آنتی اکسیدانی، ضد میکروبی و ضد التهابی است. روغن انگور با غلظت ۲۰ درصد، تمام باکتری های مورد تحقیق به جزء باسیلوس امیلولیکیفاسینس را مهار می کند. در این تحقیق نیز روغن هسته انگور خالص اثر مهاری روی باکتری های مورد مطالعه نشان داد. همچنین روغن هسته انگور در غلظت های ۴ و ۲۰ درصد به عنوان عوامل ضد باکتری برای جلوگیری از خراب شدن مواد غذایی نیز مفید است (۱۲). آب ازونه شده دارای اثرهای ضد باکتری قوی در برابر استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین (MRSA) است که ثابت می کند، استفاده موضعی از ازون می تواند یک گزینه درمان قوی برای عفونت های پوستی ناشی از MRSA باشد. در تحقیق این مقاله نیز آب ازونه نتایج مشابهی را روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس ایجاد نمود. به نظر می رسد که درمان با ازون از طریق القای فرآیندهای تکثیر سلولی و ترمیم بافتی، افزایش خون رسانی به بافت و کمک

دیواره سلول و تولید انرژی و پیش ماده ساخت بسیاری از هورمون ها می توانند خواص درمانی خاص خود را داشته و به شکل ترکیبی و غنی شده با ازون می توانند خواص ضد باکتریایی نشان دهند. استفاده از روغن های گیاهی ازون در درمان زخم های بد و عفونی در بسیاری از کشورهای اروپایی انجام می شود (۲۱).

نتیجه گیری

روغن های ازون دارای اثرهای ضد باکتریایی متفاوتی هستند. این مطالعه نشان داد استفاده از روغن های ازون به عنوان یک ماده آنتی باکتریال به ویژه در موارد مقاومت آنتی بیوتیکی به صورت فرمولاسیون های مختلف قابل توصیه است و امکان استفاده از آن را به عنوان مکمل های آنتی بیوتیکی مطرح می نماید.

سپاسگزاری

از سرکار خانم مهندس سپیده یوسفی که در نوشتن این مقاله یاری نموده اند، تشکر و قدردانی به عمل می آورم. این مقاله پژوهشی حاصل بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد میکروبیولوژی بوده که با کد ۱۰۳۳۰۵۴۸۹۶۲۰۲۱ در دانشگاه آزاد اسلامی ارومیه به ثبت رسیده است.

هسته انگور ازون را می توان به عنوان یک جایگزین طبیعی مؤثر برای کنترل مسمومیت غذایی ناشی از پاتوژن های مواد غذایی به ویژه /استافیلوکوکوس/ اورئوس با ایمنی مناسب به کار برد (۱۵). در بررسی حاضر نیز روغن هسته انگور ازون بیش ترین اثر ضد باکتریایی را روی باکتری استافیلوکوکوس نشان داد. مطالعه ای تأثیر پماد روغن زیتون ازون روی درمان سطحی و عمقی زخم پای دیابتی نشان داد که، پماد روغن زیتون ازون یک روش سالم و مؤثر در درمان انواع زخم های پای دیابتی است (۱۶). در بررسی اثر ضد میکروبی روغن آفتابگردان ازون روی /استافیلوکوکوس/ اورئوس و /استافیلوکوکوس/ اپیدرمیدیس و سویه های مقاوم به متی سیلین در محیط آزمایشگاهی، حداقل غلظت مهاري و حداقل غلظت کشندگی براساس کمیته ملی استانداردهای آزمایشگاهی بالینی تعیین شد. نتایج نشان داد که روغن آفتابگردان ازون روی تمام سویه ها از جمله سویه مورد مطالعه در این مقاله مؤثر است (۱۷). در بررسی اثرهای ضد میکروبی روغن اوکالیپتوس ازون به روش استنشاقی نتایج نشان داد که روغن اوکالیپتوس ازون عوارض جانبی میلوتیک را جبران می کند که نشان می دهد روغن اوکالیپتوس می تواند جایگزین مناسبی برای داروهای شیمیایی باشد (۱۸). بررسی تأثیر دو نمونه روغن چای ازون روی سه نوع باکتری نیز نشان داد که هر سه باکتری به این روغن حساس هستند (۱۹). روغن های ازون به دلیل خاصیت ضد التهابی باعث بهبود التهابات پسوریازیس می گردند. با تحریک و تعدیل سیستم ایمنی روی هر نوع واکنش ایمنی و رفع التهاب و کاهش درد و قرمزی پوست ناشی از پسوریازیس کاربردهای حیرت آوری دارند. اکسیژن فعال موجود در روغن های ازون با خاصیت اکسیدکنندگی قوی که دارند به عنوان یک جاذب رادیکال های آزاد سمی و دتوکسی کردن، شرایط را برای دفع آن ها در بدن ایجاد می کنند (۲۰). از آنجا که ازون به خودی خود به سلول نفوذ نمی کند، اما بلافاصله با اسیدهای چرب اشباع نشده واکنش می دهد، اثرهای آن باید نتایج واکنش اکسیداتیو با روغن باشد. به همین دلیل است که روغن های ازون شده می توانند راهی برای ارسال پیام های ازون به پوست باشند. روغن های گیاهی ارگانیک براساس وجود چربی های مورد نیاز در ساخت

1. Nasseh N, Barikbin B, Taghavi L, Nasseri MA. Antibiotics pollution damaging effects on environment and review of efficiency of different methods for removing them. J of Nurse and Physician within War. 2016; 4:50-62.
2. Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H, Spratt BG. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2002; 99(11):7687-7692.
3. Morris CE, Monteil CL, Berge O. The life history of *Pseudomonas Syringae*: linking agriculture to earth system processes. Annu Rev Phytopathol. 2013; 51:85-104.
4. Karimian H, Nateghi L, Yousefi M. Comparison of seed oil characteristics between two type of Shahrodi grape (Red and Fakhri). Adv. Environ. Biol. 2012; 1:2126-30.
5. Ranjitha CY, Priyanka S, Deepika R, Smitha Rani GP, Sahana J, Prashith Kekuda TR. Antimicrobial activity of grape seed extract. WJPPS. 2014; 3(8):1483-1488.
6. Watanabe M, Masaki H, Mori T, Tsuchiya T, Konuma H, Hara-Kudo Y, Takatori K. Inactivation effects of UV irradiation and ozone treatment on the yeast and the mold in mineral water. J Food Prot. 2010; 73(8):1537-1542.
7. Rubin MB. The history of ozone. The Schonbein period, 1839-1868. Bull Hist Chem. 2001; 26(1):40-56.
8. Pai SA, Gagangras SA, Kulkarni SS, Majumdar AS. Potential of ozonated sesame oil to augment wound healing in rats. Indian J Pharm. 2014; 76(1):87-90.
9. Sagai M, Bocci V. Mechanisms of action involved in ozone therapy: is healing induced via a mild oxidative stress? Med Gas Res. 2011; 1(1):29-31.
10. Ghaderi S, Sarailoo MH, Ghanbari V. Investigation of the components and antibacterial effects of three plants essential oil *Coriandrum sativum*, *Achillea millefolium*, *Anethum graveolens* in vitro. J Shahrekord Univ Med Sci. 2012; 14-15.
11. Baydar NG, Sagdic O, Ozkan G, Cetin S. Determination of antibacterial effects and total phenolic contents of grape (*Vitis vinifera* L.) seed extracts. Int J Food Sci Technol. 2006; 41(7):799-804.
12. Song M, Zeng Q, Xiang Y, Gao L, Huang J, Huang J, Wu K, Lu J. The antibacterial effect of topical ozone on the treatment of MRSA skin infection. Mol Med Rep. 2018; 17(2):2449-2455.
13. Bocci V, Borrelli E, Travagli V, Zanardi I. The ozone paradox: Ozone is a strong oxidant as well as a medical drug. MED RES REV. 2009; 29(4):646-682.
14. Kim HS, Noh SU, Han YW, Kim KM, Kang H, Kim HO, Park YM. Therapeutic effects of topical application of ozone on acute cutaneous wound healing. JKMS. 2009; 24(3):368-374.
15. Jobling J. Essential oils: A new idea for postharvest disease control. Fruit and Veg Magazine. 2000; 11(3):50-54.
16. Elshenawie HA, Ahmed Shalan WE, Aziza EA. Effect of ozone olive oil ointment dressing technique on the healing of superficial and deep diabetic foot ulcers. J Am Sci. 2013; 9:235-250.
17. Lezcano I, Nunez N, Espino M, Gomez M. Antibacterial Activity of Ozonized Sunflower Oil, Ole ozone, against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. Ozone: Sci. Eng. 2000; 22(2):207-214.
18. Sadlon AE, Lamson DW. Immune-modifying and antimicrobial effects of *Eucalyptus* oil and simple inhalation devices. Altern Med Rev. 2010; 15(1):33-42.

19. Oroojalian F, Kasra-Kermanshahi R, Azizi MA, Bassami MR. Synergistic antibacterial activity of the essential oils from three medicinal plants against some important food-borne pathogens by microdilution method. Iran J Med Sci. 2010; 26(2):133-46.
20. Travagli V, Zanardi I, Valacchi G, Bocci V. Ozone and ozonated oils in skin diseases: A Review: Mediators Inflamm. 2010; 2010.
21. Fort NM, Aichmair A, Miller AO, Girardi FP. L5-S1 *Achromobacter xylosoxidans* infection secondary to oxygen-ozone therapy for the treatment of lumbosacral disc herniation. A Case Report and Review of the Literature. Spine. 2014; 39(6):413-416.

