NCMBJ
Research article

New Cell Mol Biotech
j.10/40 , 2020

Scan online to view this article

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

Mona Mokhtarnejad[1], Mahmoud Pooryousef Miandoab[1*], Shahram Armeideh[2]

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 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

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-20]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1399.10.40.3.2]

Corresponding author:
Department of Agroecology, Urmia Branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran
Email: Pooryousefm@yahoo.com

مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی مولکولی
دوره ۱۰ - شماره۴۰ - پاییز ۱۳۹۹
مقاله پژوهشی

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[1]، محمود پوریوسف میاندوآب[1*]، شهرام آرمیده[2]

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، واحد ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران
۲- گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ایران

چکیده

سابقه و هدف: به‌دلیل مقاومت باکتری‌های بیماری‌زا به آنتی‌بیوتیک‌های رایج و اثرهای مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها روی ارگان‌های بدن محققین در پی یافتن عوامل ضد میکروبی با منشاء گیاهی، ارگانیک و عوامل فیزیکی، به‌عنوان داروهای جایگزین هستند. هدف از این مطالعه بررسی اثر ضد باکتریایی روغن هسته انگور ازونه روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا است.

مواد و روش‌ها: روغن هسته انگور به‌وسیله سوکسله استخراج و ازونه گردید، سپس قدرت تأثیر روغن هسته انگور ازونه با استفاده از شاخص‌های اندازه قطر هاله مهاری و حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا با استفاده از روش تجزیه واریانس آنوا ارزیابی و تعیین گردید.

یافته ها: مقایسه اندازه قطر هاله مهاری رشد به‌وسیله تیمارهای مختلف نشان داد روغن ازونه و آب ازونه دارای مهارکنندگی بالایی هستند ($P< ۰/۰۵$). کدورت و شفافیت حاصل از روغن ازونه در چاهک‌های میکروپلیت و میزان حداقل غلظت مهارکنندگی (۰/۱۲۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و حداقل غلظت کشندگی (غیرمؤثر) روی باکتری‌ها را نشان داد.

نتیجه گیری: طبق نتایج به‌دست آمده روغن هسته انگور ازونه را می توان به‌عنوان جایگزینی طبیعی برای کنترل این پاتوژن‌ها به‌ویژه استافیلوکوکوس اورئوس به‌کار برد.

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

مقدمه

علی‌رغم اثرهای درمانی دلخواه داروهای صنعتی، به‌دلیل عوارض جانبی ناخواسته آن‌ها، روز به‌روز گرایش مردم به استفاده از این داروها کاسته شده و در عوض گرایش به مصرف داروهایی با منشاء طبیعی افزایش یافته است. امروزه نیز استفاده از روغن‌های گیاهی حاوی گاز ازون به دلیل خواص ضد میکروبی و نداشتن اثرهای سوء بر محیط و بدن انسان مورد توجه قرارگرفته است (۱). از طرفی باکتری‌های بیماری‌زای انسانی نظیر *استافیلوکوکوس اورئوس* (*Staphylococcus aureus*) و *سودوموناس آئروژینوزا* (*Pseudomonas aeruginosa*) نیز عامل مهم ایجاد طیف وسیعی از عفونت‌ها هستند (۳،۲). درخت انگور (*Vitis vinifera L.*) از تیره ویتاسه است (۴). روغن هسته انگور دارای ارزش تغذیه‌ای بالایی است که می‌توان آن را به محتوای بالای اسیدهای چرب غیراشباع و وجود انواع ویتامین‌ها، توکروفرول، پلی‌فنول‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها نسبت داد. میزان روغن هسته انگور از ۱۱/۶ تا ۱۹/۶ درصد متغییر است. این روغن غنی از

نویسنده مسئول:
گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، واحد ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران
پست الکترونیکی: Pooryousefm@yahoo.com
تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۰/۱۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۷/۲۳

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-20]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1399.10.40.3.2]

اسیدهای اولئیک و لینولئیک بوده و به‌ترتیب 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 به‌کار برده می‌شوند. ازون مکانیسم‌های باکتری‌کشی، قارچ‌کشی و ویروس‌کشی را بروز می‌دهد که همین امر سبب می‌گردد از آن به‌عنوان 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 هپاتیت 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 حالی‌که 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 در۴۰ درجه فارنهایت در یخچال نگهداری شود، کارایی خود را برای بیش از ده سال حفظ می‌کند. استفاده از این ژل روی پوست کاربردهای زیادی هم‌چون 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 مهاری 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 فناور 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 به‌دست آید. پلیت‌ها یک شب در ۳±۳۷ 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 به‌خوبی 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 ۰/۰۴۸ مول بر لیتر به ۵/ ۹۹ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۰/۱۸ مول برلیتر 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 $۱/۵\times۱۰^{۸}$ 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 به‌مدت 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

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-20]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1399.10.40.3.2]

تبخیر کننده دوار تحت خلاء و در دمای ۶۵ درجه سلسیوس از آن جدا شد و به‌منظور جداسازی کامل حلال باقی مانده، روغن حاصله به‌مدت ۵ ساعت در آون خلاء ۶۵ درجه سلسیوس قرار داده شد. روغن هسته انگور به‌مدت 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 میلی‌لیتر بودند با استفاده از سوآپ سترون روی محیط کشت مولر هینتون آگار تلقیح شده، سپس دیسک‌های بلانک سترون به قطر ۶ میلی‌متر 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. به‌طوری‌که هرکدام از دیسک‌ها حاوی ۱ میلی‌گرم از ترکیب‌های مورد مطالعه بودند. برای کنترل مثبت از دیسک آنتی‌بیوتیک سپیروفلوکساسین ساخت کشور ایران، تهیه شده از شرکت پادتن طب و برای کنترل منفی از دیسک‌های بلانک سترون استفاده گردید. سپس پلیت‌ها در ۲±۳۷ درجه سلسیوس به‌مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت به‌طور جداگانه گرمخانه‌گذاری شدند که بعد از اتمام زمان گرمخانه‌گذاری قطر هاله عدم رشد تشکیل شده در اطراف دیسک‌های مورد آزمایش در زیر نور بررسی و با استفاده از خط‌کش اندازه‌گیری کولیس، به‌صورت میلی‌متر برای انجام کارهای آماری گزارش شد.

رقیق‌سازی روغن‌ها

برای رقیق‌سازی روغن خالص از محلول دی‌متیل 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 دی‌متیل سولفو اکسید به لوله اول وارد شد. به ۷ لوله باقی‌مانده نیز ۵۰۰ میکرولیتر محلول دی‌متیل سولفو اکسید ریخته شد. لوله اول با دستگاه ورتکس به‌خوبی مخلوط گردید. از لوله اول با سمپلر ۵۰۰ میکرولیتر برداشته و به لوله دوم وارد گردید و لوله دوم را به‌خوبی مخلوط کرده و **تا** آخرین لوله همین رویه ادامه داده شد. هنگامی‌که به لوله هشتم رسید، ۵۰۰ میکرولیتر از آن دور ریخته شد. ۰/۱۲۸ گرم از روغن ازونه نیز به‌همراه ۱۰۰۰ میکرولیتر محلول دی‌متیل سولفو اکسید با همین روش رقیق گردید و در انتهای لوله هشتم ۵۰۰ میکرولیتر آن دور ریخته شد. رقیق‌سازی 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 سوسپانسیونی از باکتری‌ها به‌طور جداگانه تهیه گردید. سپس به‌میزان ۱۶۰ میکرولیتر محیط مولر هینتون براث، ۲۰ میکرولیتر باکتری، ۲۰ میکرولیتر روغن با سمپلر به‌داخل چاهک‌های پلیت تزریق گردید. این آزمایش برای روغن هسته انگور خالص، روغن هسته انگور ازونه و به‌صورت جداگانه در ۳ تکرار انجام گرفت. پلیت‌ها بعد از مخلوط شدن در ۳±۳۷ درجه سلسیوس به‌مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری 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 ۱±۳۷ درجه سلسیوس به‌مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. پس از ۲۴ ساعت میزان رشد باکتری‌ها جهت تعیین MIC وMBC ارزیابی شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

تجزیه و تحلیل آماری داده‌های حاصله با استفاده از نرم‌افزار 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 یک‌طرفه آنوا و آزمون تکمیلی توکی اختلاف میانگین قطر هاله عدم رشد مربوط به *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سودوموناس آئروژینوزا* بررسی شد. لازم‌به ذکر است برای کاهش خطا، آزمایش‌ها در ۳ تکرار انجام

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-20]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1399.10.40.3.2]

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 نرم‌افزار اکسل ۲۰۱۶ رسم گردید.

یافته‌ها

تست انتشار روی دیسک در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* پس از ۲۴ ساعت

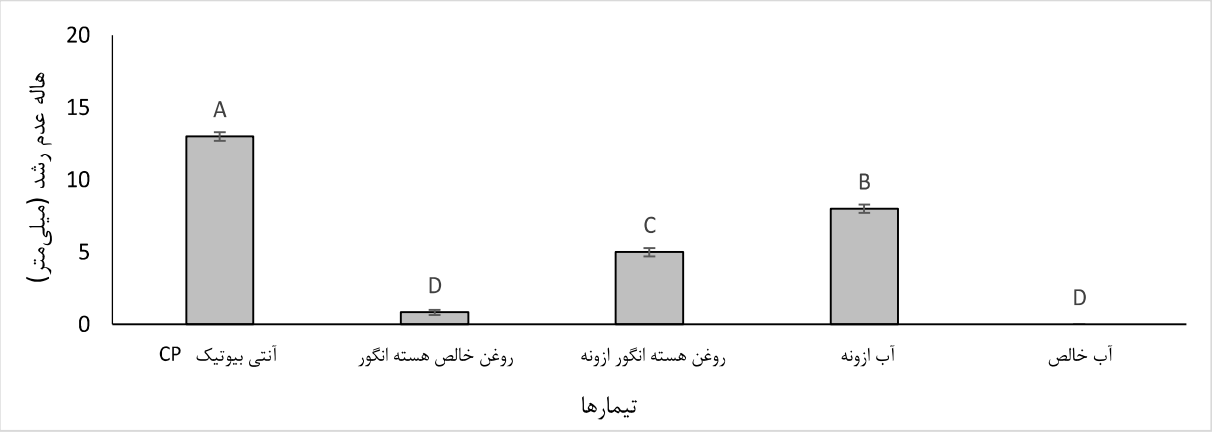
تجزیه آماری حاصل از تاثیر تیمارهای روغن هسته انگور، روغن هسته انگور ازونه، آنتی‌بیوتیک سپیروفلوکساسین به‌عنوان کنترل مثبت و آب به‌عنوان کنترل منفی در ایجاد هاله عدم رشد روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* بعد از ۲۴ ساعت اختلاف معنی‌داری بین تیمارها مشاهده شد ($F_{(4, 10)}$= ۵۱۶/۱۰۰ و P = ۰/۰۰۱) (جدول ۱). در این آزمایش تست لون بیش‌تر از آلفای مفروض (۰/۰۵) بوده و فرض همگنی واریانس‌ها محقق گردیده است (Sig= ۰/۳۶۴)، لذا داده‌های 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، آنتی‌بیوتیک سپیروفلوکساسین به‌عنوان کنترل مثبت و آب به‌عنوان 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	*۵۱۶/۱۰۰	۰/۰۰۱
خطا	۱/۶۶۷	۱۰	۰/۱۶۷		
کل	۳۴۵/۷۳۳	۱۴			

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

از مقایسه تأثیر تیمارهای مختلف روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* بعد از ۲۴ 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 (شکل۱).



شکل ۱- مقایسه میانگین (±SE) قطر هاله عدم رشد تیمارها روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* پس از ۲۴ ساعت، به‌وسیله آزمون توکی در سطح احتمال ۰/۰۵. ستون‌هایی که دارای حروف مشابه هستند اختلاف معنی‌داری ندارند.

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، آنتی‌بیوتیک سپیروفلوکساسین به‌عنوان کنترل مثبت، و آب به‌عنوان کنترل منفی در ایجاد هاله عدم رشد روی باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* بعد از ۲۴ ساعت اختلاف معنی‌داری بین تیمارها مشاهده شد ($F_{(4, 10)}$= ۵۲۴/۶۴۵ و P =۰/۰۰۱) (جدول ۲). در این آزمایش تست لون

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-20]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1399.10.40.3.2]

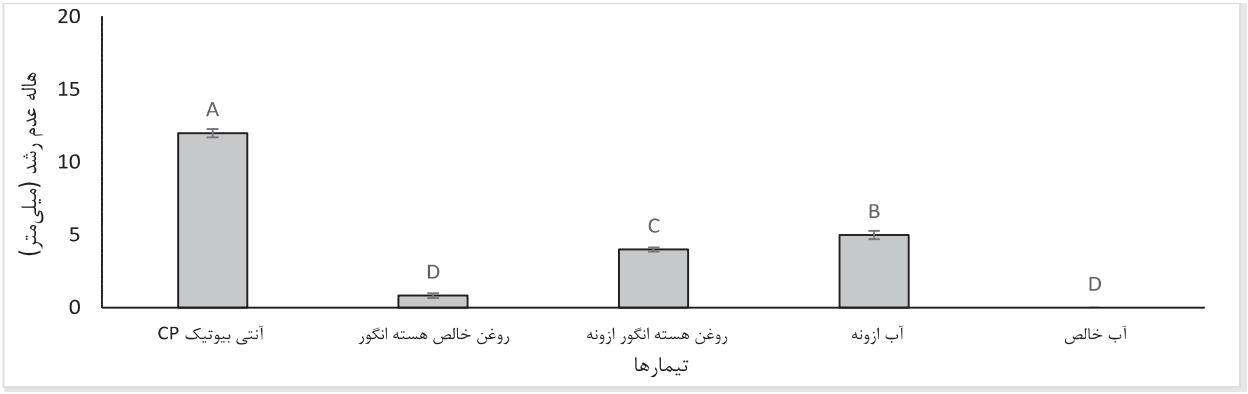
بیش‌تر از آلفای مفروض (۰/۰۵) بوده و فرض همگنی واریانس‌ها محقق گردیده است (Sig=۰/۱۲۸)، لذا داده‌های آزمایش نرمال بوده و آزمایش از دقت بیش‌تری برخوردار است.

جدول ۲- تجزیه واریانس حاصل از تأثیر تیمارهای روغن هسته انگور، روغن هسته انگور ازونه، آنتی‌بیوتیک سپیروفلوکساسین 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	۱/۲۹۲	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 آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین و سپس آب ازونه است. بعد از آب ازونه، روغن هسته انگور ازونه بیش‌ترین هاله عدم رشد را ایجادنمود(شکل ۲).



شکل ۲- مقایسه میانگین (±SE) قطر هاله عدم رشد تیمار ها 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.

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 سپیروفلوکساسین 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 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).

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.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-20]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1399.10.40.3.2]

شکل ۳- مقایسه میانگین (±SE) قطر هاله عدم رشد تیمارها روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* پس از ۴۸ ساعت، به‌وسیله آزمون توکی در سطح احتمال ۰/۰۵. ستون‌هایی که دارای حروف مشابه هستند اختلاف معنی‌داری ندارند.

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، آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین به‌عنوان کنترل مثبت، و آب به‌عنوان کنترل منفی در ایجاد هاله عدم رشد روی باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* بعد از ۴۸ ساعت اختلاف معنی‌داری بین تیمارها مشاهده شد. ($F_{(4, 10)}$=۵۲۲/۶۰۶ و P=۰/۰۰۱) (جدول ۴). در این آزمایش تست لون بیش‌تر از آلفای مفروض (۰/۰۵) بوده و فرض همگنی واریانس‌ها محقق گردیده است (Sig= ۰/۶۷۸)، لذا داده‌های آزمایش نرمال بوده و آزمایش از دقت بیش‌تری برخوردار است.

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 معنی‌داری وجود دارد.

در مقایسه تأثیر تیمارهای مختلف روی باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* 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 ۴).

میزان کشندگی و بازدارندگی تیمارها روی باکتری‌ها

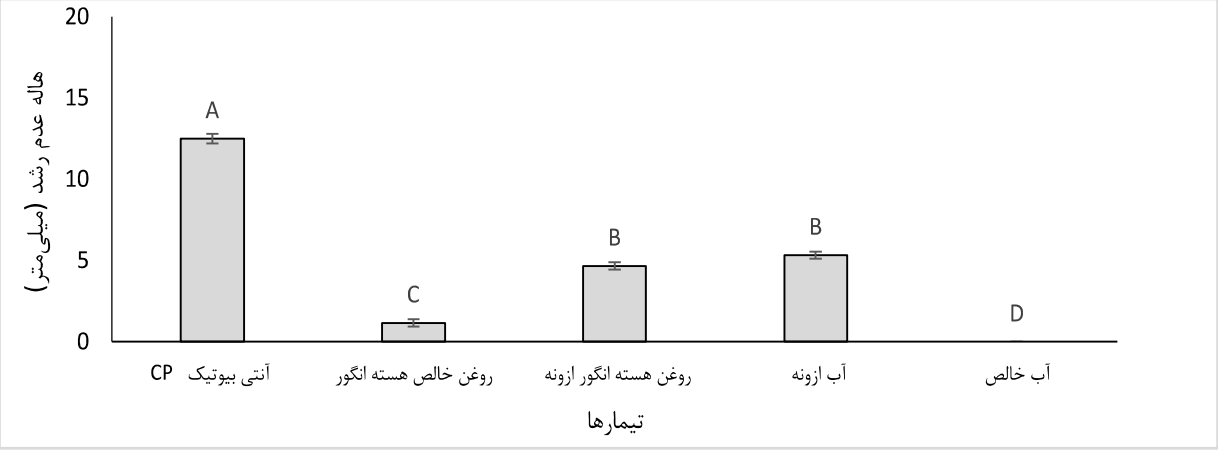
نتایج مربوط به حداقل غلظت (گرم بر میکرولیتر) ممانعت کنندگی از رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) بین تیمارهای مورد مطالعه در مقابل باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سودوموناس آئروژینوزا* در جدول ۵ نشان داده شده است.

بحث

روغن‌های گیاهی به‌واسطه داشتن طیف وسیعی از ترکیب‌های زیستی فعال به‌عنوان یک منبع بالقوه با خواص ضد باکتریایی، مورد توجه ویژه هستند، زیرا روغن‌های گیاهی به‌علت داشتن منشاء طبیعی نسبت‌به داروهای شیمیایی دارای سازگاری بیش‌تری با ارگانیسم‌های زنده از جمله بدن انسان بوده و عوارض جانبی کم‌تری ایجاد می‌کنند (۱۰). در تحقیقی اثر ضد میکروبی روغن دانه انگور روی *سودوموناس آئروژینوزا*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیاکلی* و *کلبسیلاپنومونیه* جداسازی شده از عفونت مجاری ادراری بررسی و باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به‌میزان بیش‌تری نسبت‌به سایر

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-20]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1399.10.40.3.2]



شکل ۴- مقایسه میانگین (±SE) قطر هاله عدم رشد تیمارها روی باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* پس از ۴۸ ساعت، به‌وسیله آزمون توکی در سطح احتمال ۰/۰۵. ستون‌هایی که دارای حروف مشابه هستند اختلاف معنی‌داری ندارند.

جدول ۵- میزان کشندگی و بازدارندگی تیمارها روی باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سودوموناى آئروژینوزا*

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

NE= غیر مؤثر

باکتری‌ها مهار گردید. در تحقیق حاضر نیز *استافیلوکوکوس اورئوس* به‌میزان بیش‌تری به روغن هسته انگور ازونه حساسیت نشان داد (۱۱). نتایج بررسی اثر مهاری روغن هسته انگور بر باکتری‌های مواد غذایی نشان داد که، روغن هسته انگور خالص غنی از ترکیب‌های پلی‌فنلی بوده و دارای خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی و ضد التهابی است. روغن انگور با غلظت۲۰ درصد، تمام باکتری‌های مورد تحقیق به‌جزء *باسیلوس امیلولیکیوفاسینس* را مهار می‌کند. در این تحقیق نیز روغن هسته انگور خالص اثر مهاری روی باکتری‌های مورد مطالعه نشان داد. هم‌چنین روغن هسته انگور در غلظت‌های ۴ و ۲۰ درصد به‌عنوان 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* مقاوم‌به متی‌سیلین (MRSA) است که ثابت می‌کند، استفاده موضعی از ازون می‌تواند یک گزینه درمان قوی برای عفونت‌های پوستی ناشی از MRSA باشد. در تحقیق این مقاله نیز آب ازونه نتایج مشابهی را روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* ایجاد نمود. به‌نظر می‌رسد که درمان با ازون از طریق القای فرآیندهای تکثیر سلولی و ترمیم بافتی، افزایش خون رسانی به بافت و کمک به پاکسازی زخم از عفونت موجب تسریع ترمیم زخم می‌شود، گرچه ازون یک مولکول رادیکالی نیست اما بسیار واکنشگرتر از اکسیژن است. ازون با واکنش سریع، توانایی اکسید ترکیب‌های آلی و یا غیرآلی را دارد. بنابراین، ازون می‌تواند غشای پلاسمای همه میکروارگانیسم‌ها، از جمله باکتری‌ها، ویروس‌ها و قارچ‌ها را از بین ببرد و در نهایت این میکروارگانیسم‌ها را تکه تکه کند (۱۳،۱۴). روغن هسته انگور غنی از پلی‌فنول‌ها و پروآنتوسیانیدین است. پلی‌فنول‌های رژیمی غیر قابل جذب و متابولیت‌های آن‌ها بسته به ساختار شیمیایی و غلظتشان، می‌توانند به‌عنوان فعال کننده‌ها یا بازدارنده‌های رشد میکروبی عمل کنند. این متابولیت‌ها به‌طور انتخابی از رشد پاتوژن‌های مواد غذایی مانند *لیستریا مونوسیتوژنز*، *سالمونلا تیفی موریوم*، *اشرشیا کلی* و *کامپیلوباکتر ژژونی* جلوگیری می‌کنند و رشد باکتری‌های همزیست شامل تعدادی از پروبیوتیک‌ها را تحریک کرده، بنابراین فلور میکروبی را تحت تأثیر قرار می‌دهند. علاوه‌بر این، دارای خواص آنتی‌اکسیدانی بالقوه و اثرهای سینرژیستی در فعالیت‌های ضد میکروبی در ترکیب با اسیدهای آلی (اسید مالیک، اسید تارتاریک، اسید بنزوئیک و غیره) هستند. طبق نتایج به‌دست آمده روغن

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-20]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1399.10.40.3.2]

هسته انگور ازونه را می‌توان به‌عنوان یک جایگزین طبیعی مؤثر برای کنترل مسمومیت غذایی ناشی از پاتوژن‌های مواد غذایی به‌ویژه *استافیلوکوکوس اورئوس* با ایمنی مناسب به‌کار برد (۱۵). در بررسی حاضر نیز روغن هسته انگور ازونه بیش‌ترین اثر ضد باکتریایی را روی باکتری استافیلوکوکوس نشان داد. مطالعه‌ای تأثیر پماد روغن زیتون ازونه روی درمان سطحی و عمقی زخم پای دیابتی نشان داد که، پماد روغن زیتون ازونه یک روش سالم و مؤثر در درمان انواع زخم‌های پای دیابتی است (۱۶). در بررسی اثر ضد میکروبی روغن آفتابگردان ازونه روی *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* و سویه‌های مقاوم‌به متی‌سیلین در محیط آزمایشگاهی، حداقل غلظت مهاری و حداقل غلظت کشندگی براساس کمیته ملی استانداردهای آزمایشگاهی بالینی تعیین شد. نتایج نشان داد که روغن آفتابگردان ازونه روی تمام سویه‌ها از جمله سویه مورد مطالعه در این مقاله مؤثر است (۱۷). در بررسی اثرهای ضد میکروبی روغن اوکالیپتوس ازونه به‌روش استنشاقی نتایج نشان داد که روغن اوکالیپتوس ازونه عوارض جانبی میلوتیک را جبران می‌کند که نشان می‌دهد روغن اوکالیپتوس می‌تواند جایگزین مناسبی برای داروهای شیمیایی باشد (۱۸). بررسی تأثیر دو نمونه روغن چای ازونه روی سه نوع باکتری نیز نشان داد که هر سه باکتری به این روغن حساس هستند (۱۹). روغن‌های ازونه به‌دلیل خاصیت ضد التهابی باعث بهبود التهابات پسوریازیس می‌گردند. با تحریک و تعدیل سیستم ایمنی روی هر نوع واکنش ایمنی و رفع التهاب و کاهش درد و قرمزی پوست ناشی از پسوریازیس کاربردهای حیرت‌آوری دارند. اکسیژن فعال موجود در روغن‌های ازونه با خاصیت اکسیدکنندگی قوی که دارند به‌عنوان یک جاذب رادیکال‌های آزاد سمی و دتوکسی کردن، شرایط را برای دفع آن‌ها در بدن ایجاد می‌کنند (۲۰). از آنجا که ازون به‌خودی خود به سلول نفوذ نمی‌کند، اما بلافاصله با اسیدهای چرب اشباع نشده واکنش می‌دهد، اثرهای آن باید نتایج واکنش اکسیداتیو با روغن باشد. به‌همین دلیل است که روغن‌های ازونه شده می‌توانند راهی برای ارسال پیام‌های ازون به پوست باشند. روغن‌های گیاهی ارگانیک براساس وجود چربی‌های مورد نیاز در ساخت دیواره سلول و تولید انرژی و پیش ماده ساخت بسیاری از هورمون‌ها می‌توانند خواص درمانی خاص خود را داشته و به شکل ترکیبی و غنی شده با ازون می‌توانند خواص ضد باکتریایی نشان دهند. استفاده از روغن‌های گیاهی ازونه در درمان زخم‌های بد و عفونی در بسیاری از کشورهای اروپایی انجام می‌شود (۲۱).

نتیجه‌گیری

روغن‌های ازونه دارای اثرهای ضد باکتریایی متفاوتی هستند. این مطالعه نشان داد استفاده از روغن‌های ازونه به‌عنوان یک ماده آنتی‌باکتریال به‌ویژه در موارد مقاومت آنتی‌بیوتیکی به‌صورت فرمولاسیون‌های مختلف قابل توصیه است و امکان استفاده از آن را به‌عنوان مکمل‌های آنتی‌بیوتیکی مطرح می‌نماید.

سپاسگزاری

از سرکار خانم مهندس سپیده یوسفی که در نوشتن این مقاله یاری نموده‌اند، تشکر و قدردانی به‌عمل می‌آورم. این مقاله پژوهشی حاصل بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد میکروبیولوژی بوده که با کد ۱۰۳۳۰۵۴۸۹۶۲۰۲۱ در دانشگاه آزاد اسلامی ارومیه به ثبت رسیده است.

.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-20]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1399.10.40.3.2]

منابع

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*, *Achilleh 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.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-20]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1399.10.40.3.2]

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.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-20]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1399.10.40.3.2]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1399.10.40.3.2]
[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-20]