The Journal of
Qazvin University of Medical Sciences (JQUMS)
February, March 2020. Vol 23. Num 6

Research Paper

Antibacterial Effects of Kumquat Peel Essential Oil on *Staphylococcus Aureus* and *Escherichia Coli* Bacteria in Comparison With Some Standard Antibiotics

Sara Moosazad[1], Katayoon Aghaei[1], *Razzagh Mahmoudi[2], Shaghayegh Moosavy[3], Saeed Shahsavari[4]

1. Student Research Committee, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran.
2. Medical Microbiology Research Center, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran.
3. Faculty of Medicine, Qazvin University of Medical Sciences, Iran.
4. Department of Epidemiology and Biostatics, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Use your device to scan and read the article online

Citation Moosazad S, Aghaei K, Mahmoudi R, Moosavy Sh, Shahsavari S. Antibacterial Effects of Kumquat Peel Essential Oil on *Staphylococcus Aureus* and Escherichia *Coli Bacteria* in Comparison With Some Standard Antibiotics. The Journal of Qazvin University of Medical Sciences. 2020; 23(6):504-513. https://doi.org/10.32598/JQUMS.23.6.3

https://doi.org/10.32598/JQUMS.23.6.3

CC BY NC

Received: 30 Jan 2019
Accepted: 10 Jul 2019
Available Online: 01 Feb 2020

Keywords:
Kumquat, Essential oil, Antibacterial effect, Foodborne pathogen

ABSTRACT

Background Studies have been conducted on citrus fruits and their essential oils in terms of preservative properties and the effect on food safety.
Objective This study aimed to examine the antibacterial effects of kumquat peel essential oil.
Methods In this experimental study, Kumquat fruit was purchased from the market in Qazvin, Iran. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of kumquat peel essential oil against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* strains were measured using broth microdilution method (the range of essential oil concentrations was 25000-12500-6250-3125-1562.5-781.25-390.625-195.31-97.655-48.82 µg/ml), and the diameter of the bacteria growth inhibition zone was determined by diffusion method (the percentage of essential oil was (4×10^5 µg/ml) and then compared with standard 10^6-8×10^5-6×10^5 -antibiotics. For statistical analysis, independent t-test and one-way ANOVA were used.
Findings Their mean levels of MIC and MBC for the essential oil against the *Staphylococcus aureus* were 0.42±0.18 and 1.04±0.3, and against the *Escherichia coli*, they were 0.26±0.09 and 0.42±0.18, respectively. Under Disk diffusion, the highest mean diameter of growth inhibition zone for *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* were obtained 12.1 and 10.17 mm, respectively.
Conclusion The kumquat peel essential oil has a significant antimicrobial effect on the study bacteria. As an herbal product, it can be useful as an alternative to synthetic drugs and food additives.

Extended Abstract

1. Introduction

Foodborne pathogens are a group of microorganisms that cause foodborne diseases. Finding effective drugs against these diseases is essential. Foodborne diseases have increased worldwide and have become a leading cause of death [1]. Several foodborne pathogens have been identified that affect the health and safety of humans and animals. Since the use of antibiotics for the treatment of infectious diseases, it has been observed that bacteria have resistance to them [2]. Due to the increasing desire of consumers to use natural products and food free of chemical preservatives, studies have been conducted on the plants and aromatic fruits

Corresponding Author:
Razzagh Mahmoudi
Address: Medical Microbiology Research Center, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran.
Tel: +98 (912) 7868571
E-Mail: r.mahmodi@yahoo.com

and their extracts in terms of preservative properties and the effect on food safety. Their preservative properties are mostly because of their essential oils and metabolite components [3].

Kumquat is a fruit-bearing tall tree of the Rutaceae family [4]. Their fruits are eaten whole, and are used in making products such as marmalade and sauces. Dried Kumquat was often used as a traditional medicine for the treatment of respiratory tract infections such as hoarseness and cough [5]. The fruits' color is orange. This plant is native to China, but today it is grown in many parts of the world, including northern Iran [6]. An important feature of Kumquat plant fruits is their consumable skin which is rich in a variety of metabolites and substances useful for human health [7]. In this study, we aimed to investigate the antimicrobial effect of the essential oil of kumquat peel on foodborne pathogens including *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in comparison with some standard antibiotics.

2. Materials and Methods

The kumquat fruite was purchased from market in Qazvin, Iran in January 2017. The skin of the fruit was removed with a sharp knife and after crushing, the skin was dried in the shade and at room temperature. After that, the dried skin was thoroughly powdered using an electric grinder machine [8]. The essential oil was extracted by Kleveng-er apparatus using steam distillation method for 3 hours. For disk diffusion test, the bacteria were first introduced into Brain Heart Infusion Broth (BHI Broth) Then, from colonies in this medium, 0.5 MacFarland was diluted and 100 ppm of pre-prepared suspension was removed and was poured into the Mueller Hinton Agar medium and spread by Pasteur Pipette. Then, paper discs were placed on an empty plate and 20 ppm of different concentrations of essential oil was poured onto them. At the same time, ampicillin, amoxicillin, tetracycline and chloramphenicol antibiotics were used to compare the effect of essential oil. In this regard, the bacteria were cultured uniformly on the Mueller-Hinton agar surface and then placed on the surface of antibiotic-impregnated discs at a specific concentration. Finally, the plates were incubated at 37 °C for 24 hours [9].

Minimum Inhibitory Concentration (MIC) measurements were carried out in a 96-well sterile microplate using broth microdilution technique. First, 100 µl from the BHI Broth medium was poured into the 96- well microplate. To the first well of each row, 100 µl of kumquat peel essential oil (dissolved in dimethyl sulfoxide solvent) was added. Then, 100 µl was taken from the first well and poured into the second well and, after being repeatedly filling and emptying by a sampler, 100µl was taken from the second well and poured into the third well. This work continued until well No. 11. Wells No. 11 of each row, as control essential oil (negative control), contained only medium and essential oil. Wells No. 12 of each row, as control bacteria (positive control) to determine the turbidity of the bacteria, contained the medium, dimethyl sulfoxide and bacteria. To determine the MIC of bacterial growth, the lowest concentration level that had no turbidity, was considered as a MIC level [10]. To measure the Minimum Bactericidal Concentration (MBC), 10 µl were taken from the turbidity-free wells (MIC concentrations and more) under very sterile conditions near the flame, and inoculated and cultured on the surface of Tryptic Soy Agar. After 24-h incubation at 37 °C, the lowest concentration that could kill 99.9% of the bacteria was considered as MBC level [11].

3. Results

The essential oil yield of kumquat peel in this study was obtained 6.66% using following Formula 1:

1. Percentage of essential oil yield=100×(dry weight of plant peel/essential oil weight)

The results of MIC and MBC measurements for essential oil of kumquat peel against the study bacteria are shown in Table 1. The results showed that *Staphylococcus aureus* is less sensitive to the essential oil compared to *Escherichia coli*. Based on independent t-test results, the mean levels of MIC and MBC aganist the study bacteria were not significantly different (P=0.089 and 0.468). Their mean levels against the *Staphylococcus aureus* were 0.42±0.18 and 1.04±0.3, and against the *Escherichia coli*, they were 0.26±0.09 and 0.42±0.18, respectively. The results of

Table 1. The mean MIC and MBC levels for kumquat peel essential oil against the study bacteria

Bacteria	MIC (µg/ML)	MBC (µg/ML)
Staphylococcus Aureus	0.42±0.18	1.04±0.3
Escherichia Coli	0.26±0.09	0.42±0.18
P	0.468	0.089

ANOVA showed a significant difference in the diameter of the growth inhibition zones between the five concentrations of extracted essential oil against the study bacteria ($P<0.001$). In other words, different concentrations of the kumquat peel essential oil had a significant effect on the diameter of the growth inhibition zone.

4. Discussion

Kumquat peel essential oil has significant antibacterial effect which is different depending on the species and the growth region. With high yield of Kumquat fruit, the variety of its species and the increase in its consumption in Iran, the use of this fruit as a combination of antimicrobial and natural preservative, instead of chemical preservatives, in the food and pharmaceutical industries can be beneficial.

Compliance with ethical guidelines

The present study was approved by the Ethics Committee of Qazvin University of Medical Sciences (code: 14003076).

Funding

This study was extracted from the research proposal of first author (Code: 14003076) supported by the Research Committee of Qazvin University of Medical Sciences.

Authors' contributions

Writing and investigation: Sara Moosazad; Methodology and experiments: Katayoon Aghaei, Shaghayegh Moosavy; Supervision, project administration, and funding acquisition: Razzagh Mahmoudi; Data curation and analysis: Saeed Shahsavari.

Conflicts of interest

The authors declared no conflict of interest.

Acknowledgment

Authors appreciate Deputy of the Vice Chancellor for Research in Medical Sciences of Qazvin University.

اثرات ضدباکتریایی اسانس پوست میوه کامکوات بر *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلای* و مقایسه آن با برخی آنتی‌بیوتیک‌های استاندارد

سارا موسی‌زاد[۱]، کتایون آقایی[۱]، *رزاق محمودی[۲]، شقایق موسوی[۳]، سعید شهسواری[۴]

۱. کمیته تحقیقات دانشجویی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم‌پزشکی قزوین، قزوین، ایران.
۲. مرکز تحقیقات میکروب‌شناسی پزشکی دانشگاه علوم‌پزشکی قزوین، قزوین، ایران.
۳. دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم‌پزشکی قزوین، قزوین، ایران.
۴. گروه اپیدمیولوژی و آمار زیستی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم‌پزشکی تهران، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۰ بهمن ۱۳۹۷
تاریخ پذیرش: ۱۹ تیر ۱۳۹۸
تاریخ انتشار: ۱۲ بهمن ۱۳۹۸

چکیده

زمینه تحقیقات بسیاری بر روی مرکبات و اسانس آن‌ها از نظر خاصیت نگهدارندگی و تأثیر بر ایمنی مواد غذایی صورت گرفته است.

هدف این مطالعه با هدف تعیین اثرات ضدباکتریایی اسانس پوست میوه کامکوات انجام شده است.

مواد و روش‌ها در این مطالعه تجربی میوه کامکوات در اوایل زمستان سال ۱۳۹۶ از بازار شهر قزوین خریداری شد. حداقل غلظت بازدارندگی رشد و حداقل غلظت کشندگی اسانس پوست میوه کامکوات برای سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلای* با استفاده از روش میکرودایلوشن (دامنه غلظت اسانس ۴۸/۸۲-۹۷/۶۵۵-۱۹۵/۳۱-۳۹۰/۶۲۵-۷۸۱/۲۵-۱۵۶۲/۵-۳۱۲۵-۶۲۵۰-۱۲۵۰۰۰-۲۵۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و قطر هاله عدم رشد باکتری‌ها با روش دیسک دیفیوژن تعیین شد و با دامنه غلظت‌های ۴×۱۰^{۵}، ۶×۱۰^{۵}، ۸×۱۰^{۵}، $۱۰^{۶}$ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، اسانس پوست میوه با آنتی‌بیوتیک‌های استاندارد مقایسه شد. برای بررسی وجود اختلاف معنی‌دار در نتایج از آزمون‌های آنوای یک‌طرفه و تی مستقل استفاده شد.

یافته‌ها غلظت ۰/۱۸±۰/۴۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر اسانس پوست میوه کامکوات بر ضد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و غلظت ۰/۰۹±۰/۲۶میکروگرم بر میلی‌لیتر اسانس بر ضد باکتری *اشریشیا کلای* بیشترین اثر مهار کنندگی را از خود نشان داد. در روش دیسک دیفیوژن هم میانگین بیشترین قطر هاله عدم رشد برای *استافیلوکوکوس اورئوس* و اشریشیاکلای به ترتیب ۱۲/۱ و ۱۰/۱۷میلی‌متر تعیین شد.

نتیجه‌گیری اثر ضدمیکروبی اسانس پوست میوه کامکوات علیه باکتری‌های موردمطالعه قابل‌توجه بود؛ بنابراین به عنوان یک فراورده گیاهی استفاده از آن می‌تواند مفید باشد و همچنین می‌تواند جایگزینی برای داروها و افزودنی‌های غذایی سنتزی باشد.

کلیدواژه‌ها:
کامکوات، اسانس، اثر ضدباکتریایی، بیماری‌زاهای غذازاد

مقدمه

بیماری‌زاهای غذا، گروهی از میکروارگانیسم‌ها هستند که باعث ایجاد بیماری‌های منتقله از غذا می‌شوند؛ بنابراین بسیار ضروری است که داروهای مؤثری علیه شیوع این‌گونه بیماری‌ها ساخته شود. بیماری‌های منتقله از غذا در سراسر جهان افزایش یافته و به یک علت مرگ‌ومیر تبدیل شده‌اند [۱]. هزاران باکتری بیماری‌زای غذازاد شناسایی شده‌اند که بر سلامت و ایمنی انسان و حیوانات تأثیر می‌گذارند. باکتری‌های *سالمونلا*، *اشریشیا کلای*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *لیستریا*، *سودوموناس*، *پروتئوس* در این زمینه شاخص هستند که سبب شیوع بیماری‌های غذازاد می‌شوند [۲]. باکتری گرم منفی *اشریشیا کلای* یکی از عوامل اصلی ایجادکننده عفونت‌های غذایی است که اسهال خونی، تهوع و دل‌پیچه‌های شدید و حتی مرگ را در بیماران باعث شده و به عنوان عامل اصلی تولید سم وروتوکسین شناخته شده است. این باکتری ممکن است از طریق منابعی مانند گوشت چرخ‌کرده، لبنیات مخصوصاً شیر، آبمیوه غیرپاستوریزه، سیب‌زمینی، سبزی‌های خام، سالاد، کالباس، سوسیس و همبرگر وارد بدن شده و ایجاد بیماری کند. همچنین باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* یک باکتری گرم مثبت با قابلیت تولید انتروتوکسین است که از طریق گوشت، مرغ، تخم مرغ، ماهی، شیر و فراورده‌های آن و سس‌های خامه‌ای در بدن انسان ایجاد مسمومیت می‌کند [۳].

* **نویسنده مسئول:**
رزاق محمودی
نشانی: مرکز تحقیقات میکروب‌شناسی پزشکی دانشگاه علوم‌پزشکی قزوین، قزوین، ایران
تلفن: ۷۸۶۸۵۷۱ (۹۱۲) ۹۸+
رایانامه: mahmodi@yahoo.com.r

تقریباً از زمانی اینکه آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان بیماری‌های عفونی معرفی شدند، باکتری‌ها قادر به ایجاد مقاومت در برابر آن‌ها بوده‌اند [۴]. به علت افزایش میل مصرف‌کنندگان به استفاده از محصولات طبیعی و مواد غذایی فاقد نگهدارنده‌های شیمیایی، تحقیقاتی بر روی گیاهان و میوه‌های معطر و عصاره آن‌ها از نظر خاصیت نگهدارندگی و تأثیر بر ایمنی مواد غذایی صورت گرفته است. قسمت اعظم خاصیت نگهدارندگی مربوط به اسانس و اجزای تشکیل‌دهنده آن‌هاست [۵]. روغن اسانس شامل مونوترپن‌ها، الکل، آلدئیدها، کتون‌ها و استرهاست که مونوترپن دارای فعالیت ضدمیکروبی بالاتر نسبت به هیدروکربن‌هاست [۶].

کامکوات درختی پُرپشت و انبوه با مقدار محصول بالا از خانواده روتاسه است. میوه‌های آن کروی و بیضی‌شکل است. میوه‌های کامکوات معمولاً به صورت کامل خورده می‌شوند و یک مزه شیرین در ابتدا و کمی تند در پایان دارند [۷]. رنگ آن نارنجی است. این میوه بومی کشور چین است، اما امروزه در بسیاری از مناطق جهان از جمله شمال ایران می‌روید [۸]. این میوه‌ها در تولید فراورده‌هایی مانند مارمالاد و سس‌ها کاربرد دارند. کامکوات خشک‌شده در گذشته اغلب به عنوان یک داروی سنتی برای درمان امراض مجاری تنفسی مانند گرفتگی صدا و سرفه استفاده می‌شد [۷].

گل‌دهی کامکوات‌ها به طور معمول در سه مرحله روی می‌دهد. میوه‌های پدیدآمده از گل‌های نخست بزرگ‌ترند و کیفیت بهتری دارند. ویژگی مهم این میوه قابل مصرف بودن پوست آن است که سرشار از انواع متابولیت و مواد مفید برای سلامت انسان است [۷]. به صورت کلی پوست مرکبات می‌تواند غنی از ترکیبات فنلی و فیبرهای رژیمی باشد که معمولاً به عنوان زباله در محیط دفع می‌شوند. این مواد می‌توانند منابعی کم‌هزینه و با دسترسی آسان جهت تولید مواد غذایی جدید یا بهبود فراورده‌های قدیمی‌تر باشند [۹].

این میوه بیشتر توسط پنی‌سیلیوم دیجیتاتوم و پنی‌سیلیوم ایتالیکوم فاسد می‌شود. ذخیره‌سازی سرد یک روش مؤثر برای طولانی‌شدن عمر مفید میوه است؛ به‌ویژه هنگامی که با ترکیبات بعد از گل‌دهی به غیر از قارچ‌کش‌های مصنوعی ترکیب شده است که رشد بیماری‌زاها را بدون کاهش مواد شیمیایی میوه به تأخیر می‌اندازد [۱۰]. در این مطالعه بر آن شدیم تا اثر ضدمیکروبی اسانس پوست میوه کامکوات را بر باکتری‌های بیماری‌زای غذازاد شاخص شامل *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلای* در مقایسه با برخی آنتی‌بیوتیک‌های استاندارد مورد بررسی قرار دهیم.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی که در آزمایشگاه دانشکده بهداشت دانشگاه علوم‌پزشکی قزوین انجام شد، میوه کامکوات در اوایل زمستان سال ۱۳۹۶ از بازار قزوین خریداری شد. پوست میوه با استفاده از یک چاقوی تیز با دقت گرفته شد و پس از خردکردن، پوست در سایه و دمای اتاق خشک شد. سپس پوست خشک‌شده با استفاده از آسیاب برقی کاملاً پودر شد [۵]. ۱۰۰ گرم از پودر پوست کامکوات آسیاب‌شده به بالون ژوژه منتقل و یک لیتر آب مقطر به آن افزوده شد [۵]. اسانس توسط دستگاه کلونجر[1] با استفاده از روش تقطیر با بخار آب به مدت سه ساعت استخراج و بازده اسانس پوست میوه کامکوات در این مطالعه نسبت به وزن خشک میوه با فرمول شماره ۱، ۶/۶۶ درصد محاسبه شد.

۱۰۰ ×(وزن خشک گیاه / وزن اسانس)= درصد بازده اسانس .۱

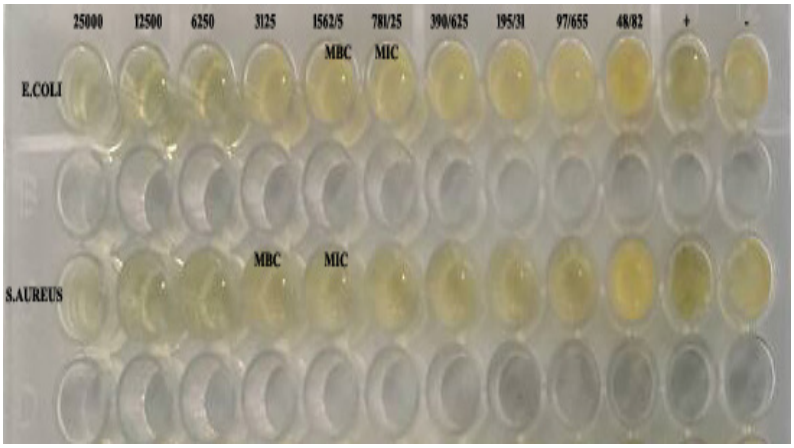
پس از آبگیری، اسانس توسط سولفات سدیم خشک شد و تا هنگام استفاده در ظروف شیشه‌ای تیره در یخچال در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شد [۱۱].

برای انجام آزمایشات انتشار دیسک، ابتدا از کشت ۲۴ساعته باکتری سوسپانسیونی که در هر میلی‌لیتر حاوی ۱۰۸ cfu.ml باکتری است با استفاده از دستگاه اسپکتوفوتومتر برابر با جذب ۰/۰۱۳–۰/۰۸ در طول موج ۶۲۵ نانومتر تهیه شد. غلظت‌های مختلف ۴×۱۰^{۵}، ۶×۱۰^{۵}، ۸×۱۰^{۵}، $۱۰^{۶}$ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از اسانس تهیه شد. هر دیسک با قطر ۶/۴ میلی‌متر از غلظت‌های تهیه‌شده اشباع شد. سپس دیسک‌ها به مدت یک ساعت روی صفحه مشبک استریل گذاشته شد تا اسانس به طور کامل جذب دیسک شود. جهت مقایسه هاله‌های عدم رشد از آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین، آموکسی‌سیلین، تتراسایکلین و کلرامفنیکل استفاده شد.

در این آزمایشات از محیط کشت مولر هینتون آگار استفاده شد. بعد از ریختن محیط کشت درون پلیت و بسته‌شدن آن، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی دارای ۱۰۸ cfu.ml روی محیط کشت ریخته و با اسپریدر در تمام نقاط محیط کشت پخش شد. سپس بلافاصله دیسک‌های تهیه‌شده از اسانس پوست میوه با غلظت‌های مختلف در فاصله مناسب از یکدیگر کاشته شد. محیط‌های کشت، برای مدت ۲۴ ساعت در گرم‌خانه با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس قطر هاله‌های عدم رشد با خط‌کش اندازه‌گیری شد [۱۲، ۱۳].

به دلیل عدم حلالیت اسانس پوست میوه کامکوات در محیط کشت حاوی آب از دی متیل سولفوکساید[2] به عنوان حلّال و امولوسیفایر استفاده شد. با تکرار آزمایش‌های متناوب بهترین میزان حلالیت اسانس به دست آمد. سپس در یک لوله آزمایش استریل ۵۰ میکرولیتر اسانس خالص پوست میوه کامکوات ریخته شد و ۱۹۵۰ میکرولیتر از حلّال DMSO به

1. Clevenger
2. Dimethyl sulfoxide (DMSO)



شکل ۱. میکروپلیت ۹۶خانه‌ای (روش براث میکرودایلوشن)
+ کنترل مثبت / حاوی محیط کشت و باکتری
- کنترل منفی / حاوی محیط کشت و اسانس

مجله‌علمی
دانشگاه‌علوم‌پزشکی قزوین

آن اضافه شد و با شیکر هم زده شد. از این استوک برای آزمون‌های بعدی استفاده شد [۱۴].

آزمایش حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی رشد[3]، در میکروپلیت ۹۶ چاهکی استریل و با روش براث میکرودایلوشن[4] انجام شد. این میکروپلیت‌ها، دارای ۸ ردیف ۱۲چاهکی به حجم ۲۵۰ میکرولیتر هستند. ابتدا از محیط کشت نوترینت براث، ۱۰۰ میکرولیتر داخل ۹۶ چاهک میکروپلیت ریخته شد. به اولین چاهک هر ردیف، توسط سمپلر، ۱۰۰ میکرولیتر از اسانس پوست میوه کامکوات (که در حلّال DMSO حل شده بود) اضافه شد؛ سپس ۱۰۰ میکرولیتر از چاهک اول برداشته و در چاهک دوم ریخته و بعد از چندبار پُر و خالی کردن توسط سمپلر، ۱۰۰ میکرولیتر از چاهک دوم برداشته و به چاهک سوم ریخته شد. این کار، تا چاهک شماره ۱۱ ادامه داده شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از محیط کشت حاوی هر باکتری که معادل کدورت نیم مک فارلند شده بود، به تمام چاهک‌ها به استثنای چاهک شماره ۱۱ هر ردیف اضافه شد. چاهک‌های شماره ۱۱ هر ردیف، به عنوان شاهد اسانس (کنترل منفی)، فقط حاوی محیط کشت و اسانس بود. چاهک‌های شماره ۱۲ هر ردیف، به عنوان شاهد باکتری (کنترل مثبت) حاوی محیط کشت، DMSO و باکتری‌ها بود.

پس از تلقیح باکتری‌ها، میکروپلیت بر روی شیکر به مدت ۳۰ ثانیه قرار داده شد تا مخلوط کاملاً یکنواخت شود؛ سپس جذب نوری با استفاده از دستگاه الیزا ریدر در ساعت صفر و با طول موج ۶۳۰ نانومتر خوانده شد. در مرحله آخر، میکروپلیت در انکوباتور با دمای۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد و بعد از اتمام انکوباسیون، کدورت یا عدم کدورت در چاهک‌ها به صورت چشمی مشاهده و نیز جذب نوری توسط الیزا ریدر خوانده شد. برای تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد، کمترین غلظتی که کدورتی نداشت و به عبارت دیگر رشد باکتری در آن مشاهده نشد، به عنوان عدد MIC منظور شد [۱۴].

برای اندازه‌گیری حداقل غلظت کشندگی[5]، از چاهک‌های فاقد کدورت (غلظت‌های MIC و بیشتر از آن) مقدار ۱۰ میکرولیتر در شرایط کاملاً استریل و در نزدیکی شعله برداشته و بر روی محیط بلاد آگار تلقیح و کشت داده شد. پس از انکوباسیون ۲۴ساعته در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، کمترین رقّتی که توانست ۹۹/۹ درصد باکتری‌ها را بکشد، به عنوان رقّت MBC در نظر گرفته شد [۱۴].

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نسخه ۱۱ نرم‌افزار آماری SPSS انجام شد. برای بررسی وجود اختلاف معنی‌دار در نتایج به‌دست‌آمده از آزمون‌های آنوای یک‌طرفه[6] و تی مستقل[7] استفاده شد. کلیه مراحل آزمایش، سه‌بار تکرار شد و نتایج به صورت میانگین ارائه شد.

یافته‌ها

نتایج حاصل از سنجش MIC و MBC اسانس پوست میوه کامکوات علیه باکتری‌های موردبررسی براساس آزمون تی مستقل به صورت میانگین در جدول شماره ۱ و شکل شماره ۱ قابل مشاهده است. این پژوهش نشان داد که باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در مقایسه با *ای کلای* حساسیت کمتری نسبت به اسانس دارد. نتایج حاصل از بررسی اثر ضدباکتریایی اسانس پوست میوه کامکوات به روش دیسک و مقایسه آن با آنتی‌بیوتیک‌های استاندارد در جدول‌های شماره ۲ و ۳ نشان داده شده است.

3. Minimum inhibitory concentration (MIC)
4. Broth microdilution
5. Minimum bactericidal concentration (MBC)
6. Oneway anova
7. Independent test

جدول ۱. میانگین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و کشندگی (MBC) اسانس پوست کامکوات علیه باکتری‌های موردمطالعه (برحسب میکروگرم بر میلی‌لیتر)

باکتری	میانگین±انحراف معیار	
	میکروگرم بر میلی‌لیتر (MIC)	میکروگرم بر میلی‌لیتر (MBC)
استافیلوکوکوس اورئوس	۰/۴۲±۰/۱۸	۱/۰۴±۰/۳
اشریشیا کلای	۰/۲۶±۰/۰۹	۰/۴۲±۰/۱۸
سطح معنی‌داری	P=۰/۴۶۸	P=۰/۰۸۹

مجله‌علمی
دانشگاه‌علوم‌پزشکی قزوین

جدول ۲. میانگین قطر هاله‌های عدم رشد اسانس پوست میوه کامکوات علیه باکتری‌های موردمطالعه (بر حسب میلی‌متر)

باکتری	غلظت‌های مختلف تهیه‌شده از اسانس (میانگین±انحراف معیار) ($\bar{x}$±SD)				سطح معنی‌داری
	۴×۱۰^۵	۶×۱۰^۵	۸×۱۰^۵	۱۰^۶	
استافیلوکوکوس اورئوس	■[۱۰]	۸/۲۴±۰/۲۵	۸/۶۶±۰/۵۷	۱۲/۱±۰/۲	P<۰/۰۰۱*
اشریشیا کلای	■	۵/۲۳±۰/۲۵	۹/۳۳±۰/۲۸	۱۰/۱۷±۰/۲۸	P<۰/۰۰۱*

*سطح معنی‌داری

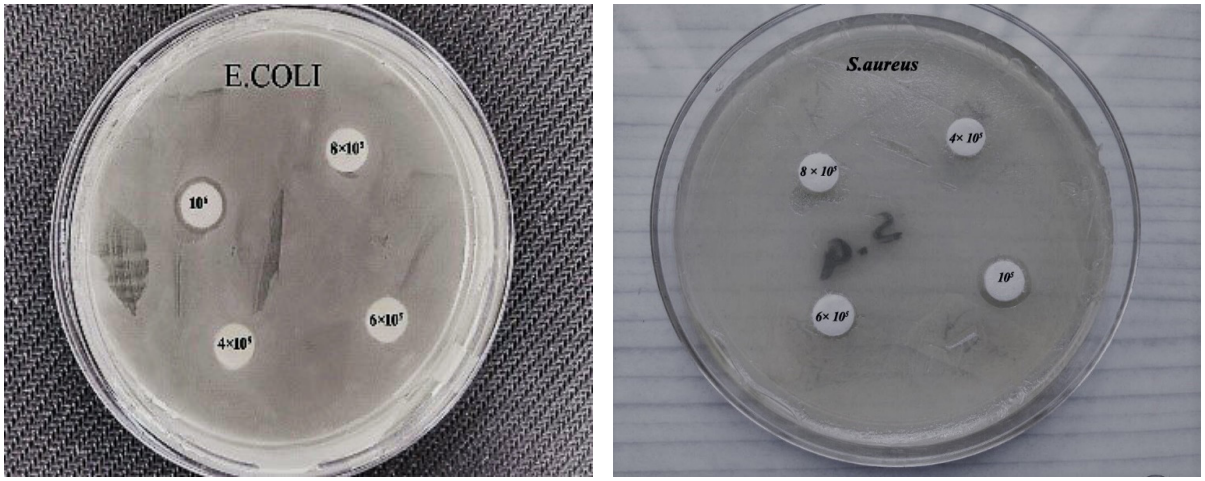
جدول ۳. میانگین نتایج آزمون آنتی‌بیوگرام هاله عدم رشد دیسک‌های مختلف آنتی‌بیوتیک (برحسب میلی‌متر)

باکتری	آنتی‌بیوتیک (میانگین±انحراف معیار)				سطح معنی‌داری
	آموکسی‌سیلین	آمپی‌سیلین	کلرامفنیکل	تتراسایکلین	
استافیلوکوکوس اورئوس	■	■	۳۰/۶±۰/۷	۳۰/۸±۰/۵	P<۰/۰۰۱*
اشریشیا کلای	■	■	■	۳۰/۳±۰/۵۷	P<۰/۰۰۱*

*سطح معنی‌داری

مجله‌علمی
دانشگاه‌علوم‌پزشکی قزوین

نتایج آزمون آنالیز واریانس نشان‌دهنده این بود که تفاوت معناداری بین قطر هاله‌های عدم رشد در پنج غلظت مختلف اسانس استخراج‌شده، علیه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلای* وجود داشت (P<۰/۰۰۱). به عبارت دیگر غلظت‌های مختلف تأثیر معناداری بر قطر هاله عدم رشد داشت (P<۰/۰۰۱). مشاهدات حاکی از این بود که قطر هاله



شکل ۲. روش دیسک دیفیوژن علیه باکتری‌های موردمطالعه با غلظت‌های مختلف اسانس

مجله‌علمی
دانشگاه‌علوم‌پزشکی قزوین

عدم رشد باکتری‌ها تقریباً مانند یکدیگر است. به طور کلی در هر دو باکتری با افزایش غلظت اسانس، قطر هاله عدم رشد نیز افزایش یافت (شکل شماره ۲).

بر اساس نتایج آزمون آنالیز واریانس، تفاوت معناداری بین قطر هاله‌ها در چهار آنتی‌بیوتیک علیه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* وجود داشت (P<۰/۰۰۱). همچنین مشخص شد که آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین و کلرامفنیکل در مقایسه با اسانس اثر مهاری بیشتری بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* داشت. بر اساس این آزمون تفاوت معناداری بین قطر هاله‌های عدم رشد در چهار آنتی‌بیوتیک موردمطالعه، علیه باکتری *اشریشیا کلای* مشاهده شد (P<۰/۰۰۱). تنها آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین بر باکتری *اشریشیا کلای* اثر مهارکنندگی داشت.

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج این دو روش نشان داد که باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در مقایسه با باکتری *اشریشیا کلای* مقاومت بیشتری نسبت به اسانس پوست میوه کامکوات دارد.

مطابق با داده‌های مندرج در جدول شماره ۱ غلظت ۰/۱۸±۰/۴۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر اسانس پوست میوه کامکوات بر ضد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و غلظت ۰/۲۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر بیشترین اثر مهار کنندگی را از خود نشان دادند. همچنین اسانس پوست این میوه به ترتیب در غلظت‌های ۳/۳۳ و ۰/۵۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر باعث مهار رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلای* شد.

در روش دیسک دیفیوژن میانگین بیشترین قطر هاله عدم رشد توسط اسانس پوست کامکوات برای *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلای* به ترتیب ۱۲/۱ و ۱۰/۱۷ میلی‌متر شد (جدول شماره ۲). همچنین نتایج نشان داد که قطر هاله عدم رشد برای هر دو باکتری با افزایش غلظت اسانس افزایش می‌یابد (شکل شماره ۲). با مقایسه قطر هاله عدم رشد دیسک‌های آنتی‌بیوگرام مشخص شد که آنتی‌بیوتیک‌های آموکسی‌سیلین و آمپی‌سیلین در مقایسه با اسانس، فاقد اثر مهاری بر *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلای* بودند. همچنین آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل فاقد اثر مهاری بر *اشریشیا کلای* بود.

ستانی[8] و همکارانش در آلمان مطالعه‌ای بر روی اثر اسانس مرکبات مختلف از جمله کامکوات علیه ۴۳ گونه لیستریا، ۳۵ گونه *استافیلوکوکوس اورئوس* و ۱۴ گونه *سالمونلا* انجام دادند و گزارش کردند که قدرت ضدمیکروبی علیه گرم مثبت‌ها بسیار بیشتر بود [۱۵]. در مطالعه حاضر نیز بالابودن حساسیت *استافیلوکوکوس اورئوس* در مقایسه با *اشریشیا کلای* نسبت به اسانس کامکوات کاملاً مشهود بود. همچنین وانگ[9] و همکارانش در چین مطالعه‌ای روی ترکیبات شیمیایی اسانس خلال میوه کامکوات انجام دادند. این فعالیت‌ها به صورت کیفی و کمّی با توجه به وجود یا عدم وجود مناطق مهار، قطرهای منطقه، مقادیر MIC و MBC مورد ارزیابی قرار گرفت و میزان MIC برای *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلای* به ترتیب ۶۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تعیین شد. آن‌ها گزارش کردند که اسانس موردنظر دارای خاصیت ضدمیکروبی بسیار زیادی علیه باکتری‌های گرم مثبت (*استافیلوکوکوس اورئوس* / *باسیلوس سرئوس*/ *باسیلوس سوبتیلوس* / *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس*) و گرم منفی (*ای کلای سالمونلا تیفی موریوم*) است. نتایج آزمون‌های این مطالعه در مقایسه با نتایج مطالعه حاضر بیشتر بود که می‌توان علت را به تفاوت در منطقه رشد میوه موردنظر نسبت داد. به این صورت که تفاوت در منطقه رشد می‌تواند در ترکیبات اسانس میوه مربوطه تفاوت ایجاد کند. همچنین روش اسانس‌گیری نیز می‌تواند متفاوت باشد [۱۶].

یانگ[10] و همکارانش در مطالعه‌ای خاصیت ضدالتهابی و ضدمیکروبی پوست مرکبات از جمله کامکوات (گونه فورتولیکا جاپونیکا) علیه بیماری زاهای پوست انسان شامل *استافیلوکوکوس اورئوس*، *پروپیونی باکتریوم آکنس* و *کاندیدا آلبیکنس* را مورد بررسی قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان‌دهنده خاصیت ضدمیکروبی بسیار زیاد مرکبات موردمطالعه از جمله کامکوات بود [۱۷]. چن[11] و همکاران مطالعه‌ای بر روی خواص بیولوژیکی مرکبات سایز کوچک در تایوان انجام دادند که کامکوات نیز جزء آن‌ها بود. ترکیبات فرّار اسانس و فیتواسترول‌های آن توسط روش کروماتوگرافی گازی و فلاوونوئیدها و لیمونوئیدها توسط روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا مورد آنالیز قرار گرفت. آن‌ها میزان بالای فلاوونوئید در اسانس این میوه و همچنین خاصیت آنتی اکسیدانی آن را گزارش کردند که از این خواص می‌توان جهت جلوگیری از بیماری‌های مزمن استفاده کرد [۱۸].

ترائو[12] و همکاران در مطالعه‌ای به بررسی نقش و تأثیر دو جزء اصلی میوه کامکوات، یعنی بتاکریپتوگزانتین و آر ـ لیمونن در ایمنی سیستم بدن پرداختند. در این پژوهش از پودر لیوفیلیزه کامکوات استفاده شد. بر اساس نتایج، مشخص شد که مصرف کامکوات به صورت روزانه باعث سرکوب سطوح بالای کورتیکواسترول پلاسما و کاهش سمّیت سلولی ناشی از استرس می‌شود و این دو جزء سبب افزایش فعالیت سلول‌هایی شد که در ایمنی ذاتی بدن در حذف سلول‌های سرطانی نقش دارند [۱۹]. آنیس بن[13] و همکاران فعالیت ضدمیکروبی

8. Settani
9. Vang
10. Yang
11. Chen
12. Teraou
13. Anis Ben

اسانس لیمو را در برابر گرم مثبت‌ها از جمله باسیلوس سرئوس، انتروباکتر فکالیس، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سوبتیلیس*، *لیستریا مونوسیتوژنز* و باکتری‌های گرم منفی شامل *سودوموناس آئروژینوزا*، *ای کلای* و *سالمونلا* مورد بررسی قرار دادند و فعالیت آنتی‌باکتریایی با ارزیابی محدوده مهار و تعیین مقادیر MIC مورد ارزیابی قرار گرفت. آن‌ها گزارش کردند که بیشترین مهارکنندگی مربوط به *لیستریا مونوسیتوژنز* (۲۶ میلی‌متر) و پس از آن *باسیلوس سرئوس* (۲۴ میلی‌متر) و *استافیلوکوکوس اورئوس* (۲۲ میلی متر) بود. در میان گرم منفی‌ها، بیشترین مهارکنندگی در برابر *سالمونلا* (۱۸ میلی‌متر) مشاهده شد. با توجه به نتایج مهارکنندگی در این مطالعه، تأثیر این اسانس بر باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از باکتری‌های گرم منفی بود که از این جهت با مطالعه ما مطابقت داشت. همچنین میزان MIC از ۰/۰۳۹ تا ۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای باکتری‌های گرم مثبت و از ۰/۲۵ تا ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای باکتری‌های گرم منفی متغیر بودند [۲۰].

گو[14] و همکاران به بررسی اجزای شیمیایی و فعالیت ضدمیکروبی اسانس پوست پرتقال گانان ناول پرداختند و فعالیت ضدمیکروبی آن را علیه میکروارگانیسم‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیا کلای*، *باسیلوس سوبتیلیس* و *ساکارومایسس سرویزیه* سنجیدند و به این نتیجه رسیدند که میانگین MIC گزارش‌شده برای میکروارگانیسم‌های موردنظر به ترتیب ۳/۱۳، ۱/۵۶، ۰/۷۸ و ۰/۳۹ بود. مانند مطالعه حاضر میزان MIC در *استافیلوکوکوس اورئوس* بیشتر از *اشریشیا کلای* بود که از این نظر با مطالعه ما همخوانی داشت، اما به طور کلی مقادیر MIC در این مطالعه بالاتر بود که می‌توان علت آن را به تفاوت در ترکیبات اسانس و یا تفاوت در سویه‌های مختلف باکتری دانست. تجزیه و تحلیل ترکیبات اسانس آن با استفاده از روش کروماتوگرافی گازی انجام و ۲۷ نوع ترکیب در آن شناسایی شد [۲۱].

نتایج حاصل از بررسی اثرات ضدمیکروبی نشان می‌دهند که فعالیت ضدمیکروبی اسانس پوست میوه کامکوات بسته به گونه و منطقه رشد متفاوت است؛ همین مورد می‌تواند در موادی که دارای خاصیت ضدمیکروبی هستند تفاوت ایجاد کند. ولی با این حال گونه‌های این میوه فعالیت ضدباکتریایی قابل توجهی دارند؛ درنتیجه با بازدهی بالای اسانس این میوه، تنوع گونه‌های آن و افزایش مصرف کامکوات در ایران، از این گونه میوه می‌توان به عنوان ترکیب ضدمیکروبی و نگهدارنده طبیعی و جایگزین نگهدارنده‌های شیمیایی در صنایع دارویی و غذایی استفاده کرد.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این مقاله حاضر مستخرج از طرح دانشجویی مصوب دانشگاه علوم‌پزشکی قزوین است (کد ۱۴۰۰۳۰۷۶).

حامی مالی

این مقاله بر اساس طرح تحقیقاتی خانم سارا موسی‌زاد و با حمایت کمیته تحقیقات دانشگاه علوم‌پزشکی قزوین انجام شده است.

مشارکت نویسندگان

نگارش و مجری پژوهش: سارا موسی‌زاد؛ مشارکت در انجام مراحل آزمایشگاهی: کتایون آقایی؛ استاد راهنما و نظارت و مدیریت پروژه: رزاق محمودی؛ کارشناس آزمایشگاه و مشارکت در مراحل آزمایشگاهی: شقایق موسوی؛ نگارش و تحلیل داده‌ها: سعید شهسواری.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان این مقاله تعارض منافع ندارد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از معاونت پژوهشی علوم‌پزشکی دانشگاه قزوین تقدیر و تشکر می‌شود.

14. Gou

References

[1] Shariatifar N, Mostaghim T, Afshar A, Mohammadpourfard I, Sayadi M, Rezaei M. Antibacterial properties of essential oil of Heracleum persicum (Golpar) and foodborne pathogens. Int J Enteric Pathog. 2017; 5(2):41-4. [DOI:10.15171/ijep.2017.10]

[2] Wang Y, Ye Z, Ying Y. New trends in impedimetric biosensors for the detection of foodborne pathogenic bacteria. Sensors. 2012; 12(3):3449-71. [DOI:10.3390/s120303449] [PMID] [PMCID]

[3] Barati A, Mohammadi Sani A, Yavarmanesh M. In vitro study on the composition and antibacterial effects of aqueous and methanol extracts of Scrophularia khorassanica on some of food-borne pathogens. J Food Hyg. 2016; 6(2):13-23. [In Persian] https://www.sid.ir/fa/Journal/ViewPaper.aspx?ID=274795

[4] Trojanowska D, Paluchowska P, Soja Ł, Budak A. Activity of thyme oil (Oleum thymi) against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. Acta Pol Pharm. 2016; 73(4):975-81. [PMID]

[5] Moosavy MH, Hassanzadeh P, Mohammadzadeh E, Mahmoudi R, Khatibi SA, Mardani K. Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of lemon (Citrus limon) peel in vitro and in a food model. J Food Qual Hazard Control. 2017; 4(2):42-8. http://jfqhc.ssu.ac.ir/article-1-335-en.html

[6] Henderson AH, Fachrial E, Nyoman Ehrich Lister I. Antimicrobial activity of lemon (Citrus limon) peel extract against *Escherichia coli*. Am Sci Res J Eng Technol Sci. 2018; 39(1):268-73. https://asrjetsjournal.org/index.php/American_Scientific_Journal/article/view/3805

[7] Mohammadi M, Asadi M, Poorfallah Z, Nahardani M. Mathematical modeling and measure of effective moisture diffusivity in drying process of thin layer kumquat fruit slabs. Innov Food Sci Technol. 2012; 4(2):47-56. [In Persian] https://www.sid.ir/fa/journal/ViewPaper.aspx?id=210953

[8] Jaliliantabar F, Lorestani AN, Gholami R. Physical properties of kumquat fruit. Int Agrophys. 2013; 27(1):107-9. [DOI:10.2478/v10247-012-0074-y]

[9] Rafiq Sh, Kaul R, Sofi SA, Bashir N, Nazir F, Nayik GA. Citrus peel as a source of functional ingredient: A review. J Saudi Soc Agric Sci. 2018; 17(4):351-8. [DOI:10.1016/j.jssas.2016.07.006]

[10] Palma A, D'Aquino S. Kumquat-Fortunella japonica. In: Rodrigues S, de Oliveira Silva E, de Brit ES, editors. Exotic Fruits. Cambridge, MA: Academic Press; 2018. p. 271-8. [DOI:10.1016/B978-0-12-803138-4.00035-6] [PMID]

[11] Qadir R, Anwar F, Mehmood T, Shahid M, Zahoor S. Variations in chemical composition, antimicrobial and haemolytic activities of peel essential oils from three local Citrus cultivars. Pure Appl Biol. 2018; 7(1):282-91. [DOI:10.19045/bspab.2018.70034]

[12] Valizadeh S, Fakheri T, Mahmoudi R, Katiraee F, Gajarbeygi P. Evaluation of antioxidant, antibacterial, and antifungal properties of Satureja hortensis essential oil. Biotechnol Health Sci. 2014; 1(3):e24733. [DOI:10.17795/bhs-24733]

[13] Mortezavi SH, Azadmard Damirchi S, Mahmodi R, Sowti M, Shirmohammadi M. Chemical composition and antioxidant properties of hull and core of Pistacia khinjuk stocks. Iran Food Sci Technol Res J. 2015; 11(4):408-19. [In Persian] [DOI:10.22067/ifstrj.v1394i11.28180]

[14] Zare Bidaki M, Arab M, Khazaei M, Afkar E. Anti-bacterial effect of Mentha spicata L. essential oil on eight standard species of gastrointestinal pathogens. J Birjand Univ Med Sci. 2014; 21(3):274-82. [In Persian]

[15] Settanni L, Palazzolo E, Guarrasi V, Aleo A, Mammina C, Moschetti G, et al. Inhibition of foodborne pathogen bacteria by essential oils extracted from citrus fruits cultivated in Sicily. Food Control. 2012; 26(2):326-30. [DOI:10.1016/j.foodcont.2012.01.050]

[16] Wang YW, Zeng WC, Xu PY, Lan YJ, Zhu RX, Zhong K, et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of kumquat (Fortunella crassifolia Swingle) peel. Int J Mol Sci. 2012; 13(3):3382-93. [DOI:10.3390/ijms13033382] [PMID] [PMCID]

[17] Yang EJ, Kim S, Moon JY, Oh TH, Baik JS, Lee NH, et al. Inhibitory effects of Fortunella japonica var. margarita and Citrus sunki essential oils on nitric oxide production and skin pathogens. Acta Microbiol Immunol Hung. 2010; 57(1):15-27. [DOI:10.1556/AMicr.57.2010.1.2] [PMID]

[18] Chen MH, Yang KM, Huang TC, Wu ML. Traditional small-size Citrus from Taiwan: Essential oils, bioactive compounds and antioxidant capacity. Medicines. 2017; 4(2):28. [DOI:10.3390/medicines4020028] [PMID] [PMCID]

[19] Terao R, Murata A, Sugamoto K, Watanabe T, Nagahama K, Nakahara K, et al. Immunostimulatory effect of kumquat (Fortunella crassifolia) and its constituents, β-cryptoxanthin and R-limonene. Food Funct. 2019; 10(1):38-48. [DOI:10.1039/C8FO01971A] [PMID]

[20] Osanloo M, Amani A, Sereshti H, Shayeghi M, Sedaghat MM. Extraction and chemical composition essential oil of Kelussia odoratissima and comparison its larvicidal activity with Z-ligustilide (major constituent) against Anopheles stephensi. J Entomol Zool Stud. 2017; 5(4):611-6. https://www.researchgate.net/publication/330324086

[21] Guo Q, Liu K, Deng W, Zhong B, Yang W, Chun J. Chemical composition and antimicrobial activity of Gannan navel orange (Citrus sinensis Osbeck cv. Newhall) peel essential oils. Food Sci Nutr. 2018; 6(6):1431-7. [DOI:10.1002/fsn3.688] [PMID] [PMCID]