

شناسایی ترکیبات فیتوشیمیایی، پتانسیل آنتی اکسیدانی و فعالیت ضد میکروبی اسانس ترنج (Bergamot) بر تعدادی از میکروارگانیسم های عامل عفونت در شرایط برون تنی

محمد نوشاد^{*}، بهروز علیزاده بهبهانی^۱

(۱) گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۹/۶

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۰/۲۶

چکیده

مقدمه: ترنج یا برگاموت با نام علمی *Citrus bergamia* متعلق به خانواده مرکبات است. هدف از این مطالعه، شناسایی ترکیبات فیتوشیمیایی، پتانسیل آنتی اکسیدانی و ارزیابی فعالیت ضد میکروبی اسانس ترنج بر تعدادی از سویه های عفونت زا در شرایط برون تنی بود.

مواد و روش ها: در این پژوهش تجربی، ترکیبات فیتوشیمیایی اسانس ترنج با استفاده از دستگاه کروماتوگراف گازی متصل به طیف سنجی جرمی شناسایی شد. پتانسیل آنتی اکسیدانی اسانس ترنج به روش کاهش ظرفیت رادیکالی و بر اساس IC₅₀ تعیین گردید. از روش های کربی-بوئر، انتشار در آگار (چاهک)، رقت سازی در مایع و پورپلیت (حداقل غلظت کشندگی) برای ارزیابی فعالیت ضد میکروبی اسانس ترنج استفاده شد.

یافته های پژوهش: نتایج حاصل از بررسی اجزای فیتوشیمیایی، تعداد ۱۹ ترکیب در اسانس ترنج را اثبات نمود. ترکیبات Linalool (۳۱/۵۸ درصد) و Limonene (۲۱/۴۷ درصد) بخش عمده تشکیل دهنده اسانس بودند. فعالیت آنتی اکسیدانی اسانس ترنج بر اساس IC₅₀ برابر با ۲۱۲ میکروگرم بر میلی لیتر بود. حداقل غلظت ممانعت کنندگی اسانس ترنج برای سویه های سودوموناس ائروژینوزا، اشرشیاکلی، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و استرپتوکوکوس پیوژنز به ترتیب برابر با ۴، ۸، ۲ و ۲ میلی گرم بر میلی لیتر بود، در حالی که نتایج حداقل غلظت کشندگی اسانس برای باکتری های مذکور ۴، ۴، ۸، ۴ میلی گرم بر میلی لیتر بود.

بحث و نتیجه گیری: نتایج این مطالعه تجربی نشان داد که اسانس ترنج دارای اثر ضد میکروبی بر سویه های عفونت زا به ویژه باکتری های گرم مثبت استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و استرپتوکوکوس پیوژنز داشت. اگر چه پژوهش های بیشتری در این زمینه ضروری می باشد ولی می توان از اسانس ترنج به عنوان عوامل ضد میکروبی جدید در صنایع داروسازی و غذایی بهره برد.

واژه های کلیدی: پتانسیل آنتی اکسیدانی، اسانس ترنج، باکتری های بیماری زا، ترکیبات فیتوشیمیایی

* نویسنده مسئول: گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران

Email: noshad@ramin.ac.ir

Copyright © 2018 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

مقدمه

طی سالیان گذشته، نگاه جوامع بشری به گیاهان دارویی و اثر درمانی آن‌ها تغییر نموده و به نوعی می‌توان رویکرد مجدد جوامع صنعتی و حتی پیشرفته به گیاهان دارویی را مشاهده نمود. استفاده از گیاهان معطر و حاوی آرومای قوی عمدتاً در صنایع بهداشتی، صنعت داروسازی و صنایع غذایی می‌باشد، اما چنانچه طی مطالعات و پژوهش‌های علمی، اثر ضد میکروبی، آنتی اکسیدانی و دارویی نیز برای آن‌ها به اثبات برسد می‌توانند در زمره گیاهان دارویی قرار بگیرند. استفاده از گیاهان معطر به عنوان دم‌نوش‌های گیاهی، ادویه و چاشنی‌های غذایی و هم‌چنین منبع تهیه انواع اسانس‌ها از روزگاران قدیم رایج و مرسوم بوده است و هم‌اکنون جایگاه مهمی در صنایع داروسازی، غذایی و آرایشی بهداشتی دارند (۱،۲).

ترنج یا برگاموت با نام علمی *Citrus bergamia* گیاهی از خانواده مرکبات (Rutaceae) است که از نظر گیاه‌شناسی میوه آن به اندازه پرتقال و دارای بوی خوش و معطر می‌باشد. مزه میوه ترنج اندکی تلخ‌تر از گریپ فروت است ولی ترشی آن از لیمو کمتر است. اسانس ترنج عمدتاً از پوست میوه آن استخراج می‌گردد. از اسانس ترنج به‌طور عمده در صنعت داروسازی به دلیل نقش ضد عفونی‌کننده مورد استفاده قرار می‌گیرد. از اسانس ترنج برای مزه دادن به انواع چای و شیرینی در صنایع غذایی استفاده می‌شود. پوست میوه ترنج حاوی ترکیبات ارزشمندی هم‌چون فلاوونوئیدها و پکتین می‌باشد (۳).

امروزه تمایل مصرف‌کنندگان جهت مقابله و کنترل رشد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا استفاده از گیاهان دارویی و سنتی می‌باشد (۴). بیماری‌های عفونی ایجاد شده توسط میکروارگانیسم‌هایی همانند استرپتوکوکوس پیوژنز، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، سودوموناس اثرئوزینوزا و اشرشیاکلی سالیانه ضررهای جانی و مالی فراوانی را به جوامع بشری تحمیل می‌کنند. به نحوی که میزان مرگ و میر عفونت‌های ایجاد شده توسط استرپتوکوکوس پیوژنز به تنهایی حدود ۲۵ درصد است. میزان بیماری‌های عفونی ایجاد شده در افرادی پیر و سالخورده و هم‌چنین کسانی که

سیستم ایمنی آن‌ها ضعیف شده بیشتر از سایرین می‌باشد (۵).

اهداف این پژوهش تجربی شامل شناسایی ترکیبات فیتوشیمیایی اسانس ترنج به وسیله کروماتوگراف گازی و کروماتوگراف گازی متصل به طیف سنج جرمی و اندازه‌گیری فعالیت آنتی اکسیدانی آن با استفاده از روش کاهش ظرفیت رادیکالی بود. هدف دیگر این پژوهش ارزیابی فعالیت ضد میکروبی غلظت‌های مختلف اسانس ترنج با استفاده از روش‌های کربی-بوئر، چاهک آگار، رقت‌سازی در مایع (حداقل غلظت مهارکنندگی) و حداقل غلظت کشندگی بر باکتری‌های عفونت‌زا (اشرشیاکلی، سودوموناس اثرئوزینوزا، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و استرپتوکوکوس پیوژنز) در شرایط برون تنی بود.

مواد و روش‌ها

این پژوهش تجربی، در سال ۱۳۹۷ در آزمایشگاه‌های شیمی و میکروبیولوژی گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان انجام پذیرفت.

تهیه اسانس ترنج: اسانس برگاموت به صورت خالص تهیه گردید (تقطیر با آب و دستگاه کلونجر). اسانس ترنج تا انجام آزمون‌های شیمیایی و میکروبیولوژیکی در ظرف شیشه‌ای تیره رنگ با درب بسته که اطراف آن پوشیده شده بود در دمای یخچال نگهداری شد (۶).

شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس ترنج: تفکیک و شناسایی ترکیبات فیتوشیمیایی موجود در اسانس ترنج با دستگاه‌های کروماتوگراف گازی و کروماتوگراف گازی متصل به طیف سنجی جرمی تعیین شد. میزان تزریق اسانس ترنج و برنامه دمایی (۲۵ تا ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد) مطابق با مطالعه فیشر و همکاران (۲۰۰۶)، انجام شد. اجزای اسانس ترنج در مقایسه با طیف‌های جرمی استاندارد موجود در کتابخانه الکترونیک ویلی موجود در نرم‌افزار و مقایسه با اعداد استاندارد موجود در مراجع شناسایی گردید (۷).

تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی اسانس ترنج: فعالیت آنتی اکسیدانی اسانس ترنج مطابق با روش انجام شده

حقیرالسادات (۱۳۹۱)، انجام پذیرفت. در این روش فعالیت آنتی اکسیدانی اسانس ترنج با استفاده از روش کاهش ظرفیت رادیکالی (Radical Scavenging Capacity) و ۲، ۲-دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH) مورد ارزیابی قرار گرفت (۸). ترکیب DPPH با گرفتن یک الکترون از ترکیب آنتی اکسیدان (اسانس ترنج)، تغییر رنگ داده و از رنگ بنفش به زرد تغییر می نماید. لازم به ذکر است که رادیکال های آزاد موجود در DPPH در طول موج ۵۱۷ نانومتر جذب داشته و کاهش جذب آن با میزان ماده آنتی اکسیدانی رابطه خطی دارد. اسانس ترنج، با غلظت های مختلف با یک میلی لیتر از محلول ۹۰ میکرومولار DPPH مخلوط گردید و به وسیله متانول ۹۵ درصد به حجم رسانده شد و در تاریکی قرار گرفت. بعد از طی ۶۰ دقیقه جذب محلول ها و شاهد در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت شد و بر اساس معادله ۱، درصد کاهش ظرفیت رادیکالی محاسبه شد.

(۱)

$$\text{DPPH-RS activity (\%)} = [1 - \text{As}/\text{Ac}] \times 100$$

در این معادله As جذب نمونه و Ac جذب نمونه کنترل می باشد. از محلول متانول ۹۵ درصد به عنوان شاهد جهت صفر کردن دستگاه اسپکتروفوتومتر استفاده شد. فعالیت آنتی اکسیدانی اسانس ترنج به وسیله آنالیز همبستگی خطی حاصله از مقادیر Radical Scavenging Capacity به صورت IC_{50} گزارش شد (۸).

آماده سازی و فعال سازی سوسپانسیون باکتری ها:
در این پژوهش از سویه های عامل عفونت زای شامل: سودوموناس اثریوزا، اشرشیاکلی، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و استرپتوکوکوس پیوژنز موجود در آزمایشگاه میکروبیولوژی گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان استفاده شد. به منظور تهیه و محاسبه میزان هر یک از سویه های عامل عفونت از روش اسپکتروفوتومتری (طول موج ۶۲۵ نانومتر) استفاده گردید. هر یک از سویه های میکروبی ابتدا به طور جداگانه در محیط کشت Brain heart infusion (BHI) (مرک، آلمان) مایع فعال

شده و سپس به محیط کشت BHI آگار منتقل گردید تا کشت خالص از هر یک از باکتری ها به دست آید. کلنی خالص شده با سرم فیزیولوژی رقت سازی شد و مطابق با استاندارد نیم مک فارلند در طول موج ۶۲۵ نانومتر قرائت گردید. در این طول موج و مطابق با استاندارد نیم مک فارلند میزان سوسپانسیون میکروبی برابر با 1×10^8 CFU/ml بود (۶). برای تعیین فعالیت ضد میکروبی اسانس ترنج از روش های کربی-بوئر، چاهک آگار، رقت سازی در مایع (حداقل غلظت مهارکنندگی) و حداقل غلظت کشندگی استفاده شد. در زیر به طور اختصار این روش ها بیان شده است.

ارزیابی فعالیت ضد میکروبی اسانس ترنج بر میکروارگانیسم های عامل عفونت در شرایط برون تنی:
روش کربی-بوئر (دیسک دیفیوژن) مطابق با روش به کار رفته شده در مطالعه غفاری و همکاران (۱۳۹۵)، با اندکی تغییر انجام پذیرفت. در این روش پس از تلقیح باکتری های عامل عفونی (مطابق با استاندارد نیم مک فارلند) روی محیط کشت مولر هیتون آگار به وسیله میله ال شکل استریل عمل پخش کردن سویه های بیماری زا انجام پذیرفت. از غلظت های مختلف (۱، ۱/۲، ۱/۳ و ۱/۴) اسانس ترنج به میزان ۲۰ میکرولیتر توسط سمپلر بر دیسک های بلانک (به قطر ۶ میلی متر) به آرامی ریخته شد. پلیت ها به انکوباتور ۳۷ درجه ساعت منتقل گردید و تا طی زمان ۲۴ ساعت در این دما قرار گرفت. پس از طی زمان انکوباسیون قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک توسط خطکش به طور دقیق اندازه گیری و بر حسب میلی متر گزارش گردید (۹).

فعالیت ضد میکروبی اسانس ترنج به روش چاهک آگار مطابق با دستورالعمل به کار گرفته شده در مطالعه هامون نورد و همکاران (۱۳۹۳)، با اندکی تغییر انجام پذیرفت. در این روش تعداد ۳ عدد چاهک در پتری دیش ۸ سانتی متری حاوی محیط کشت مولر هیتون آگار به فواصل ۲۵ میلی متر از یکدیگر و ۱۵ میلی متر از دیواره پلیت ها توسط انتهای پی پت پاستور تعبیه شد. جهت جلوگیری از پخش و گسترش اسانس ترنج، در ته پتری دیش با اندکی محیط کشت مذاب پوشانده شد. در این حالت عمق هر یک از چاهک ۶ میلی متر

بود. درون هر یک از چاهک غلظت های مختلف (۱)، ۱/۲، ۱/۳ و ۱/۴) اسانس ترنج به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر ریخته شد. در نهایت پلیت ها به انکوباتور که دمای آن ۳۷ درجه سانتی گراد بود انتقال یافت. پس از طی ۲۴ ساعت از زمان گرمخانه گذاری قطر هاله عدم رشد اطراف چاهک های تعبیه شده توسط خط کش بر حسب میلی متر به طور دقیق اندازه گیری شد (۱۰).

برای تعیین حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد سویه های سودوموناس اثرورژینوزا، اشرش—یاکلی، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و استرپتوکوکوس پیوژنز توسط اسانس ترنج از روش Susceptibility Assay و پلیت های میکروتیتر ۹۶ خانه ای (Sarstedt, inc. USA) استفاده شد. در این روش برای افزایش حلالیت و گسترش یکنواختی اسانس ترنج در میکروپلیت ۹۶ خانه ای از دی متیل سولفوکساید (Dimethyl sulfoxide) به عنوان امولسیفایر کننده استفاده شد. از محلول مادر اسانس ترنج غلظت های متوالی ۲۵۶، ۱۲۸، ۶۴، ۳۲، ۱۶، ۸، ۴، ۲، ۱ و ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر تهیه شد. در این روش درون هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت های مختلف اسانس ترنج حاوی محیط کشت مولر هینتون برات ریخته شد و سپس ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی که حاوی 10^8 CFU/ml بود، به هر چاهک اضافه گردید. یک چاهک به عنوان کنترل مثبت (چاهک حاوی باکتری و محیط کشت فاقد اسانس ترنج) و یک چاهک به عنوان کنترل منفی (چاهک حاوی اسانس ترنج و محیط کشت بدون باکتری) نیز در نظر گرفته شد. میکروپلیت های ۹۶ خانه ای در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شدند. بعد از طی زمان انکوباسیون محلول ۵ درصد از معرف تری فنیل تترازولیوم کلراید تهیه شد و به میزان ۱۰ میکرولیتر به هر یک از چاهک ها اضافه گردید و دوباره به مدت ۱۵ دقیقه میکروپلیت ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوباسیون شد. مطابق با تعریف حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد، اولین غلظتی که در آن تغییر رنگ قرمز و ارغوانی مشاهده نگردد به عنوان حداقل غلظت

مهارکنندگی تعیین شد (۱۱).

برای تعیین حداقل غلظت کشندگی اسانس ترنج، ۲۰ میکرولیتر از محتویات چاهک های مربوط به حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس و چاهک هایی مربوط به غلظت های بیشتر از اسانس که تغییر رنگ قرمز یا ارغوانی قابل تشخیصی نداشتند، بر محیط کشت مولر هینتون آگار به صورت پورپلیت کشت داده شد. پس از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد رشد باکتری ها روی محیط کشت مورد بررسی قرار گرفت. غلظتی از اسانس ترنج که بر محیط کشت جامد هیچ گونه رشدی از باکتری مشاهده نشد به عنوان حداقل غلظت کشندگی تعیین شد (۱۲).

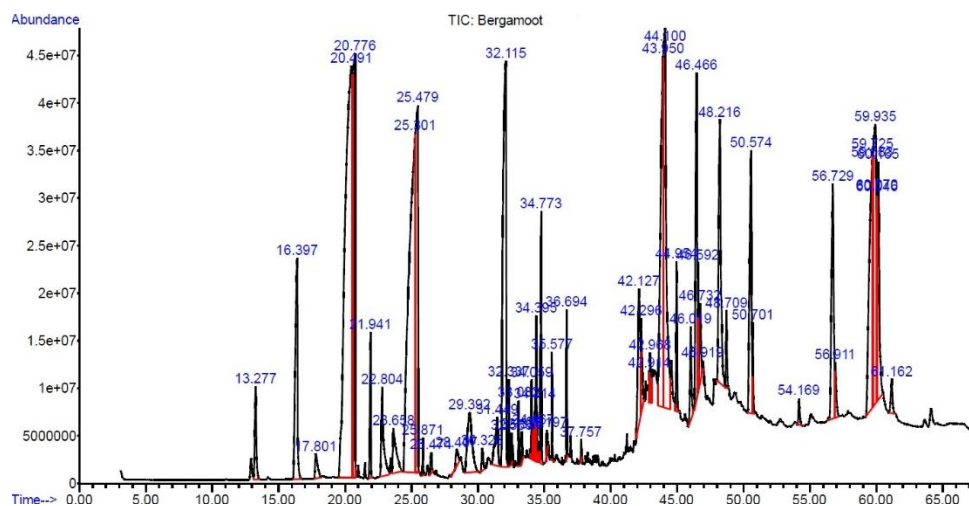
آنالیز آماری: تمامی آزمایش ها در سه مرتبه تکرار گردید، میانگین های محاسبه شده و برای آنالیزهای آماری استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده ها با کمک نرم افزار SPSS (Version 18.0, SPSS Inc., Chicago, USA) انجام شد. معنی دار بودن نتایج آنالیز واریانس در سطح ۵ درصد و با مقایسه میانگین دانکن انجام گردید.

یافته های پژوهش

نتایج شناسایی ترکیبات فیتوشیمیایی اسانس ترنج توسط کروماتوگراف گازی و کروماتوگراف گازی متصل به طیف سنجی جرمی در جدول شماره ۱، آورده شده است. همان گونه که در شکل شماره ۱، مشخص است ستون عمودی کروماتوگرام نشان دهنده میزان فراوانی ترکیبات سازنده اسانس ترنج است و ستون افقی نمودار کروماتوگرام زمان جداسازی هر یک از ترکیبات تشکیل دهنده اسانس ترنج را نشان می دهد. ۱۹ ترکیب از اسانس ترنج جداسازی و شناسایی شد که در مجموع ۹۳/۴۷ درصد ترکیبات فیتوشیمیایی اسانس ترنج را تشکیل داد. Linalool با ۳۱/۵۸ درصد بیشترین ترکیب سازنده اسانس ترنج بود. سایر ترکیبات اسانس ترنج شامل Limonene (۲۱/۴۷ درصد)، Octadecadienoic acid (۱۲ درصد)، Octadecenal (۱۱ درصد)، β -Ocimene (۶/۷۲ درصد)، β - Pinene (۲/۷۳ درصد) و Hexadecanoic acid (۱/۷۱ درصد) بودند.

جدول شماره ۱. ترکیبات شناسایی شده اسانس ترنج

ترکیب شناسایی شده	درصد	ردیف
α -Pinene	۰/۷۷	۱
β - Pinene	۲/۷۳	۲
Myrcene	۰/۳۴	۳
Limonene	۲۱/۴۷	۴
γ -Terpinene	۰/۷۸	۵
Linalool	۳۱/۵۸	۶
L- α -Terpineol	۱/۵۷	۷
β -Ocimene	۶/۷۲	۱۰
Citral	۰/۳۲	۱۱
Decadienal	۰/۱۳	۱۲
Nerylacetate	۰/۶۵	۱۳
Geranyl acetate	۱	۱۴
Bergamotene	۰/۳۱	۱۵
Bisabolene	۰/۳۹	۱۶
Hexadecanoic acid	۱/۷۱	۱۷
Octadecadienoic acid	۱۲	۱۸
Octadecenal	۱۱	۱۹
مجموع	۹۳/۴۷	



شکل شماره ۱. کروماتوگرام اسانس ترنج

رشد در روش کربی-بوئر مربوط به این باکتری بود. باکتری گرم مثبت استرپتوکوکوس پیوژنز بیشترین حساسیت (بیشترین قطر هاله عدم رشد) را در برابر اسانس ترنج از خود نشان داد. نتایج آزمون چاهک آگار نشان داد که قطر هاله عدم رشد ایجاد شده توسط ماده ضد میکروب (اسانس ترنج) برای باکتری های اشرشیاکلی و سودوموناس ائروژینوزا تقریباً یکسان بود و در مقایسه با باکتری های استرپتوکوکوس پیوژنز و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس کمتر بود.

نتایج فعالیت آنتی اکسیدانی اسانس ترنج براساس IC_{50} برابر با $2/65 \pm 2/12$ میکروگرم بر میلی لیتر بود. نتایج اثر ضد میکروبی اسانس ترنج بر سویه های سودوموناس ائروژینوزا، اشرشیاکلی، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و استرپتوکوکوس پیوژنز با روش های کربی-بوئر و چاهک آگار در جدول شماره ۲، آورده شده است. نتایج آزمون کربی-بوئر نشان داد که بیشترین مقاومت در برابر اسانس ترنج را باکتری گرم منفی اشرشیاکلی نشان داد، به عبارت دیگر کمترین هاله عدم

جدول شماره ۲. میانگین قطر هاله عدم رشد (کروی-بوئر و چاهک آگار) اسانس ترنج بر سودوموناس ائروژینوزا، اشرشیاکلی، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و استرپتوکوکوس پیوژنز بر حسب میلی متر

باکتری	چاهک آگار				دیسک دیفیوژن			
	۱	۱/۲	۱/۳	۱/۴	۱	۱/۲	۱/۳	۱/۴
سودوموناس ائروژینوزا	۱۳/۸۰±۰/۴۵ ^a	۱۰/۹۰±۰/۴۰ ^b	۷/۶۰±۰/۵۰ ^c	۷/۰۰±۰/۵۰ ^c	۱۲/۰۰±۰/۳۳ ^a	۹/۶۰±۰/۵۵ ^b	۷/۰۰±۰/۵۰ ^c	-
اشرشیاکلی	۱۳/۶۰±۰/۵۵ ^a	۱۰/۵۰±۰/۵۰ ^b	۷/۵۰±۰/۵۰ ^c	-	۱۱/۷۰±۰/۵۵ ^a	۹/۵۰±۰/۵۲ ^b	۶/۶۰±۰/۵۰ ^c	-
استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس	۱۵/۵۰±۰/۳۷ ^a	۱۳/۶۰±۰/۴۵ ^b	۱۰/۰۰±۰/۵۷ ^c	۸/۲۰±۰/۵۰ ^d	۱۴/۸۰±۰/۵۰ ^a	۱۳/۰۰±۰/۶۰ ^b	۹/۱۰±۰/۶۵ ^c	۸/۱۰±۰/۴۵ ^c
استرپتوکوکوس پیوژنز	۱۷/۱۰±۰/۵۰ ^a	۱۴/۰۰±۰/۴۲ ^b	۱۱/۰۰±۰/۳۵ ^c	۸/۴۰±۰/۵۰ ^d	۱۶/۸۰±۰/۵۰ ^a	۱۳/۰۰±۰/۳۳ ^b	۱۰/۳۰±۰/۵۰ ^c	۸/۰۰±۰/۵۰ ^d

*حروف غیر مشابه نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح معنی داری ۵ درصد است.

*حروف مشابه نشان دهنده عدم تفاوت معنی دار در سطح معنی داری ۵ درصد است.

نتایج حاصل از میانگین سه تکرار (آزمون آماری چند دامنه ای دانکن) در سطح معنی داری (P≤0.05) است و داده ها به صورت میانگین±انحراف معیار آورده شده است. (-) هاله عدم رشد مشاهده نشد.

اپیدرمیدیس و استرپتوکوکوس پیوژنز به ترتیب برابر با ۴، ۸، ۲ و ۲ میلی گرم بر میلی لیتر بود. نتایج حداقل غلظت کشندگی اسانس ترنج بر باکتری های سودوموناس ائروژینوزا، اشرشیاکلی، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و استرپتوکوکوس پیوژنز به ترتیب ۸، ۸، ۴ و ۴ بود.

نتایج فعالیت ضد میکروبی اسانس ترنج بر سویه های عامل عفونت به روش های حداقل غلظت ممانعت کنندگی و حداقل غلظت کشندگی در جدول شماره ۳، نشان داده شده است. نتایج نشان داد که حداقل غلظت ممانعت کنندگی اسانس ترنج برای سودوموناس ائروژینوزا، اشرشیاکلی، استافیلوکوکوس

جدول شماره ۳. نتایج حداقل غلظت ممانعت کنندگی و حداقل غلظت کشندگی اسانس ترنج سودوموناس ائروژینوزا، اشرشیاکلی، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و استرپتوکوکوس پیوژنز بر حسب میلی گرم بر میلی لیتر

سویه های باکتریایی	حداقل غلظت ممانعت کنندگی	حداقل غلظت کشندگی
سودوموناس ائروژینوزا	۴	۸
اشرشیاکلی	۸	۸
استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس	۲	۴
استرپتوکوکوس پیوژنز	۲	۴

بحث و نتیجه گیری

با توجه به مصرف ترنج در مواد غذایی، در مطالعه حاضر علاوه بر شناسایی ترکیبات فیتوشیمیایی و فعالیت آنتی اکسیدانی اسانس ترنج، اثر ضد میکروبی اسانس ترنج بر تعدادی از سویه های عامل عفونت (سودوموناس ائروژینوزا، اشرشیاکلی، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و استرپتوکوکوس پیوژنز) نیز بررسی شد، تا در صورت مطلوب بودن نتایج این پژوهش آزمایشگاهی، در ادامه با مطالعات گسترده تر بتوان از این گیاه ارزشمند هم در صنایع داروسازی و هم در صنعت غذا (نگهدارنده طبیعی) بهره مند شد.

ترکیبات فیتوشیمیایی شناسایی شده در اسانس ترنج در پژوهش حاضر با سایر مطالعات انجام گرفته در نقاط مختلف دنیا تا حدود زیادی مشابه بود. در مطالعه حاضر Linalool با ۳۱/۵۸ درصد بیشترین ترکیب سازنده اسانس ترنج را تشکیل داد. سایر ترکیبات دیگر اسانس ترنج شامل Limonene (۲۱/۴۷ درصد)، Octadecadienoic acid (۱۲ درصد)، Octadecenal (۱۱ درصد)، β-Ocimene (۶/۷۲ درصد)، β-Pinene (۲/۷۳ درصد) و Hexadecanoic acid (۱/۷۱ درصد) ترکیبات غالب بودند (جدول شماره ۱). چوبی و همکاران (۲۰۰۰)، ترکیبات شیمیایی گیاهان

خانواده مرکبات، از جمله دو وارسته مختلف ترنج را مورد بررسی قرار دادند. این پژوهشگران بیان کردند که Limonene با ۳۸/۸ و ۵۲/۲ درصد در هر دو وارسته مورد بررسی بیشترین ترکیب اسانس ترنج را تشکیل داد (۱۳). مقایسه نتایج مطالعه چوبی و همکاران با نتایج پژوهش حاضر نشان داد که هر چند در مطالعه ما ترکیب Limonene با ۲۱/۴۷ درصد از اجزای اصلی تشکیل دهنده اسانس ترنج بود اما ترکیب اصلی متفاوت بود. دلیل این امر را می توان به عوامل مختلفی از جمله وارسته گیاه، شرایط آب و هوایی محل کشت گیاه، طول و عرض جغرافیایی، خاک محل کشت، شرایط برداشت گیاه و هم چنین نحوه اسانس گیری نسبت داد (۶). در مطالعه فیشر و همکاران (۲۰۰۶)، گزارش شد که Limonene و Linalool به ترتیب با ۴۵ و ۱۵ درصد بخش عمده اسانس ترنج را تشکیل می دهند (۷). لی وی و همکاران (۲۰۰۷)، فعالیت ضد میکروبی و ترکیبات تشکیل دهنده چندین گیاه دارویی از جمله اسانس ترنج را مورد بررسی قرار دادند. این پژوهشگران ۳ ترکیب عمده اسانس ترنج را Bergamol، Linalool و Limonene ذکر نمودند (۱۴). در پژوهشی که کریسالار و همکاران (۲۰۰۹)، در کشور ترکیه انجام دادند مشخص گردید که Limonene با ۳۶/۸ درصد بخش عمده ترکیبات مونوترپن (۴۹ درصد)، و Linalool با ۱۳/۵ درصد بخش اصلی ترکیبات الکی را تشکیل می دهد (۱۵). توندیس و همکاران (۲۰۱۲)، فعالیت آنتی اکسیدانی و ترکیبات شیمیایی اسانس ترنج را مورد بررسی قرار دادند. این پژوهشگران گزارش دادند که ترکیبات Limonene، Linalyl acetate، Terpinene- γ و Linalool اجزای اصلی اسانس ترنج می باشد (۱۶).

بررسی پتانسیل آنتی اکسیدانی اسانس ترنج با استفاده از روش کاهش ظرفیت رادیکالی نشان داد که اسانس ترنج دارای فعالیت آنتی اکسیدانی خوبی بود. چوبی و همکاران (۲۰۰۰)، فعالیت آنتی اکسیدانی ۳۴ گونه گیاهی از خانواده مرکبات را مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهشگران نشان داد که اسانس ترنج دارای فعالیت آنتی اکسیدانی می باشد (۱۳). توندیس و همکاران (۲۰۱۲)، فعالیت آنتی اکسیدانی اسانس پوست

سه گونه مرکبات از جمله ترنج را با روش های مختلف تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی مورد بررسی قرار دادند. این پژوهشگران گزارش دادند که فعالیت آنتی اکسیدانی اسانس ترنج مطلوب و خوب بوده و در روش های رنگبری بتاکاروتن برابر با $IC_{50}=42/6 \mu g/ml$ و در روش کاهش ظرفیت رادیکالی برابر با $IC_{50}=192/9 \mu g/ml$ بود (۱۶). پژوهشگران مختلفی گزارش داده اند که ترکیباتی ترپنوئیدی همانند Carveol، Limonene و... که در اسانس و عصاره های گیاهی یافت می گردد، می توانند در درمان سرطان سینه، کبد و یا سایر سرطان های دیگر موثر باشد. چنین مطلبی می تواند تایید کند که با توجه به فعالیت آنتی اکسیدانی اسانس ترنج این اسانس می تواند به عنوان یک محافظ طبیعی در برابر رادیکال های آزاد و بیماری های ذکر شده در بالا باشد. هر چند لازم است برای تعیین مکانیسم پژوهش های گسترده تری انجام گردد (۱۷، ۱۸).

نتایج بررسی اثر ضد میکروبی اسانس ترنج به روش کربی-بوئر نشان داد که، با کاهش غلظت اسانس ترنج قطر هاله عدم رشد کاهش پیدا کرد، به طوری که مقایسه دوتایی میان غلظت های مختلف اسانس ترنج نشان داد که در تمامی غلظت ها به جز غلظت ۱/۳ و ۱/۴ برای باکتری استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس برای سایر سویه های میکروبی مورد بررسی در این پژوهش در سطح معنی داری ۵ درصد اختلاف معنی دار وجود داشت. به نظر می رسد یک رابطه مستقیمی بین غلظت اسانس ترنج با قطر هاله عدم رشد میکروبی وجود دارد. بیشترین هاله عدم رشد مشاهده شده با قطر ۱۶/۸۰ میلی متر برای باکتری گرم مثبت استرپتوکوکوس پیوژنز مشاهده شد، در این غلظت کمترین قطر هاله عدم رشد مربوط به باکتری گرم منفی اشرشیاکلی (۱۱/۷۰) بود. نتایج آزمون ضد میکروبی چاهک آگار نشان داد که قطر هاله عدم رشد میکروبی در این روش نسبت به روش کربی-بوئر بیشتر بود. پژوهشگران مختلفی به نتایج مشابه دست یافته اند (۶، ۱۱). این محققان دلیل این امر را ارتباط مستقیم بین اسانس ترنج با میکروارگانیسم در سطح محیط کشت ذکر کرده اند (۶، ۱۱). در روش کربی-بوئر به دلیل استفاده از

دیسک کاغذی باید عمل انتشار از دیسک به محیط کشت صورت بگیرد در حالی که در روش چاهک آگار اسانس به صورت مستقیم با میکروارگانیسم در تماس می باشد. نتایج آزمون چاهک آگار نشان داد که همانند روش کربی-بوئر با کاهش غلظت اسانس قطر هاله عدم رشد کاهش یافت. از نظر آماری مقایسه دو تایی میان غلظت های مختلف اسانس ترنج در روش چاهک آگار نشان داد که میان غلظت های $1/3$ و $1/4$ برای باکتری سودوموناس اثر وینوزا اختلاف معنی داری در سطح ۵ درصد مشاهده نشد، اما در سایر غلظت ها و تمامی میکروارگانیسم ها اختلاف معنی دار مشاهده گردید. نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی اسانس ترنج نشان داد که، حداقل غلظت مهارکنندگی همواره برابر یا کوچک تر از حداقل غلظت کشندگی می باشد. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که، حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی اسانس ترنج برای حساس ترین باکتری (استرپتوکوکوس پیوژنز) به ترتیب ۲ و ۴ میلی گرم بر میلی لیتر بود، در حالی که برای باکتری اشرشیاکلی به عنوان مقاوم ترین سویه ۸ و ۸ میلی گرم بر میلی لیتر بود. تاکنون مطالعات کمی در زمینه ارزیابی فعالیت ضد میکروبی اسانس ترنج انجام شده است. فیشر و همکاران (۲۰۰۶)، اثر اسانس ترنج را بر لیستریا مونوسایتوزنز، استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس، اشرشیاکلی و کمپیلوباکتر ژوژونی به دو روش دیسک دیفیوژن و حداقل غلظت مهارکنندگی مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج این پژوهشگران نشان داد که قطر هاله عدم رشد مشاهده شده برای سویه های گرم مثبت (لیستریا مونوسایتوزنز، استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سرئوس) بزرگ تر از سویه های گرم منفی (اشرشیاکلی و کمپیلوباکتر ژوژونی) بود. هم چنین نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس برگاموت بر سویه های گرم مثبت و گرم منفی نیز رنج 0.125 تا 4 درصد وزنی/وزنی داشت (۷). لی وی و همکاران (۲۰۱۱)، اثر ضد میکروبی چندین گیاه دارویی از جمله اسانس ترنج را بر تعدادی از میکروارگانیسم های بیماری زا به روش کربی-بوئر مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج این پژوهشگران نشان داد که، اسانس ترنج اثر

ضدمیکروبی بیشتری بر سویه های گرم مثبت (باسیلوس سوبتلیس و استافیلوکوکوس اورئوس) نسبت به سویه گرم منفی (اشرشیاکلی) داشت (۱۴). یافته هایی این مطالعه با نتایج پژوهش حاضر مطابقت داشت. فریدمن و همکاران (۲۰۰۴)، اثر ضد میکروبی اسانس ترنج را بر دو سویه بیماری زا اشرشیاکلی و سالمونلا انترتیدیس در آب میوه سیب مورد بررسی قرار دادند. این محققین بیان نمودند که اسانس ترنج به خوبی رشد سویه های بیماری زا را در آب میوه سیب کاهش داد (۱۹). کریسالار و همکاران (۲۰۰۹)، اثر ضد میکروبی چندین گونه مرکبات از جمله اسانس ترنج را بر تعدادی از سویه های باکتریایی (گرم مثبت و گرم منفی) و سویه های قارچی به روش کربی-بوئر مورد مطالعه قرار دادند. این پژوهشگران گزارش دادند که بیشترین قطر هاله عدم رشد مربوط به باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس با هاله بازدارندگی ۱۶ میلی متر بود (۱۵). رومانو و همکاران (۲۰۰۵)، اثر ضد قارچی اسانس ترنج را بر ۲۰ سویه قارچی مورد بررسی قرار داده و اثر ضد قارچی اسانس ترنج را مورد تایید قرار دادند (۲۰). در پژوهشی مشابه سانگوتی و همکاران (۲۰۰۶)، اثر ضد قارچی اسانس ترنج را بر ۹۲ سویه بالینی مورد بررسی قرار دادند. این پژوهشگران اثر ضد میکروبی اسانس ترنج را مطلوب گزارش دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که باکتری های گرم مثبت در برابر اسانس ترنج نسبت به باکتری های گرم منفی حساس تر بوده و در غلظت کمتری از اسانس دارای اثر بازدارندگی می باشند (۲۱). پژوهشگران زیادی دلیل این امر را اختلاف در دیواره سلولی باکتری های گرم مثبت و گرم منفی ذکر نموده اند. به نظر می رسد آسیب رساندن غیرقابل برگشت به غشای سلول باکتری است که باعث نشت مواد سیتوپلاسمی، یون ها و ایجاد کمبود سوسترهای انرژی می گردد در نهایت منجر به مرگ باکتری می شود (۶، ۱۲، ۲۲). تاکنون تحقیقات گسترده ای درباره اثر ضد میکروبی و فعالیت بیولوژیکی اسانس گیاهان دارویی در سراسر جهان انجام شده است. نتایج به دست آمده حتی در مورد گیاهان یک گونه در مناطق مختلف مطابقت کمی دیده می شود. دلیل این امر را می توان به عوامل محیطی و ژنتیکی

اسانس مذکور به خوبی می تواند رادیکال های آزاد را مهار نماید. نتایج مربوط به آنالیزهای فیتوشیمیایی اسانس مشخص کرد که ترکیبات Limonene و Linalool بخش عمده تشکیل دهنده اجزای اسانس می باشد. به طور کلی اسانس ترنج به خوبی توانست از رشد سویه های استافیلوکوکوس اورئوس، استرپتوکوکوس پیوژنز، اشرشیاکلی و سودوموناس ائروژینوزا در شرایط آزمایشگاهی جلوگیری نماید. پیشنهاد می گردد، مطالعات گسترده تری در زمینه اثر ضد میکروبی اسانس ترنج بر سایر میکروارگانیسم های بیماری زا در شرایط آزمایشگاهی و در ادامه در مدل های حیوانی مورد بررسی قرار گیرد تا بتوان از اسانس آن بهره مند شد.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله بر خود لازم می دانند که از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان تشکر و قدردانی نمایند. کد اخلاق:

نسبت داد (۶،۲۳). با توجه به پیچیدگی ساختار شیمیایی اسانس ها، مکانیسم اثر آن ها نیز گسترده می باشد و از این روی مشخص کردن راه های مولکولی مرتبط در اعمال آن ها مشکل است. به همین دلیل شاید بتوان ادعا نمود که هر یک از اجزا اسانس ها برای خود یک مکانیسم اثر جداگانه ای دارند. بر اساس نتایج آنالیز فیتوشیمیایی اسانس ترنج با دستگاه های کروماتوگراف گازی و کروماتوگراف گازی متصل به طیف سنجی جرمی مشخص گردید که ترکیبات Limonene و Linalool ترکیبات اصلی تشکیل دهنده اسانس هستند. مطالعات گذشته اثر ضد میکروبی این ترکیبات را اثبات نموده اند، بنا بر این بخش اصلی اثر ضد میکروبی اسانس ترنج را به می توان به این ترکیبات (ماهیت فنولیک یا گروه هیدروکسیل آزاد) نسبت داد (۲۴،۲۵). در این پژوهش تجربی مشخص گردید، با افزایش غلظت اسانس ترنج قطر هاله عدم رشد باکتری های بیماری زا افزایش یافت. اسانس ترنج بر باکتری های گرم مثبت اثر بازدارندگی بالاتری نسبت به سویه های گرم منفی از خود نشان داد. فعالیت آنتی اکسیدانی اسانس ترنج نشان داد که

References

- Zargari A. Medicinal plants. 6th ed. Tehran Print Ins Uni Publication. 1994; P. 13-25.
- Burt S. Essential oils their antibacterial properties and potential applications in foods a review. *Int J Food Microbiol* 2004; 94: 223-53. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022
- Mandalari G, Bennett RN, Bisignano G, Saija A, Dugo G, Lo Curto RB, et al. Characterization of flavonoids and pectins from bergamot Citrus bergamia Risso peel a major byproduct of essential oil extraction. *J Agri Food Chem* 2006; 54:197-203. doi: 10.1021/jf051847n
- Izquierdocubas F, Zambrano A, Frometa I, Gutierrez A, Bastanzuri M, Guancho H, et al. National prevalence of nosocomial infections. *J Hos Inf* 2008; 68:234-40. doi: 10.1016/j.jhin.2007.12.006
- Jay J, Loessner M, Golden D. Modern food microbiology. 7th ed. New York Springer Sci Publication. 2005; P. 123-26.
- Alizadehbehbahani B, Tabatabaeiyazdi F, Vasiee A, Mortazavi SA. Oliveria decumbens essential oil chemical compositions and antimicrobial activity against the growth of some clinical and standard strains causing infection. *Microbiol Pathobiol* 2018;114: 449-52. doi: 10.1016/j.micpath.2017.12.033
- Fisher K, Phillips CA. The effect of lemon orange and bergamot essential oils and their components on the survival of Campylobacter jejuni, Escherichia coli O157 Listeria monocytogenes Bacillus cereus and Staphylococcus aureus in vitro and in food systems. *J Appl Microbiol* 2006; 101:1232-40. doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.03035.x
- Haghiroalsadat BF, Vahidi AR, Azimzadeh M, Kalantar SM, Bernard F, Hokmollahi F. [Chemical assessment of active ingredients and anti-oxidant effects of Trachyspermum copticums seeds harvested In Yazd province]. *J Rafsanjan Uni Med Sci* 2012; 11: 197-206. (Persian)

9. Ghaffari M, Taheri A, Zobeidinezhad M. [Invitro evaluation of antibacterial effect of ethyl acetate extract of red algae *Gelidiella acerosa* on Some gram positive and gram negative bacteria]. *J Rafsanjan Uni Med Sci* 2016; 15: 209-22. (Persian)
10. Hamonnavard S, Bahrami AM, Razmjou M, Asadisamani M, Hatamilak M. [Evaluation of Nerium oleander aqueous extract effect on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermis*]. *J Shahrekord Uni Med Sci* 2013; 15: 46-54. (Persian)
11. Alizadehbehbahani B, Fooladi AAI. Evaluation of phytochemical analysis and antimicrobial activities *Allium* essential oil against the growth of some microbial pathogens. *Microbiol Pathol* 2018;114: 299-303. doi: 10.1016/j.micpath.2017.11.055
12. Yeganegi M, Yazdi FT, Mortazavi SA, Asili J, Alizadeh Behbahani B, Beigbabaei A. *Equisetum telmateia* extracts chemical compositions antioxidant activity and antimicrobial effect on the growth of some pathogenic strain causing poisoning and infection. *Microbiol Pathol* 2018; 116:62-07. doi: 10.1016/j.micpath.2018.01.014
13. 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 Agri Food Chem* 2000;48: 4156-61. doi: 10.1021/jf000227d
14. Lv F, Liang H, Yuan Q, Li C. In vitro antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. *Food Res Int* 2011; 44:3057-64. doi: 10.1016/j.foodres.2011.07.030
15. Kirbaşlar FG, Tavman A, Dulger B, Turker G. Antimicrobial activity of Turkish citrus peel oils. *Pak J Bot* 2009; 41:3207-12.
16. Tundis R, Loizzo MR, Bonesi M, Menichini F, Mastellone V, Colica C, et al. Comparative study on the antioxidant capacity and cholinesterase inhibitory activity of *Citrus aurantifolia* Swingle *C. aurantium* L. and *C. bergamia* Risso and Poit peel essential oils. *J Food Sci* 2012;77: 40-06. doi: 10.1111/j.1750-3841.2011.02511.x.
17. Crowell PL. Monoterpenes in breast cancer chemoprevention. *Bre Cancer Res Treat* 1997; 46:191-07.
18. Gould MN. Cancer chemoprevention and therapy by monoterpenes. *Envi Heal Pers* 1997; 105:977-09. doi: 10.1289/ehp.97105s4977
19. Friedman M, Henika PR, Levin CE, Mandrell RE. Antibacterial activities of plant essential oils and their components against *Escherichia coli* O157 H7 and *Salmonella enterica* in apple juice. *J Agri Food Chem* 2004; 52:6042-08. doi: 10.1021/jf0495340
20. Romano L, Battaglia F, Masucci L, Sanguinetti M, Posteraro B, Plotti G, et al. Invitro activity of bergamot natural essence and furocoumarin free and distilled extracts and their associations with boric acid against clinical yeast isolates. *J Anti Chem* 2005; 55:110-04. doi: 10.1093/jac/dkh503
21. Sanguinetti M, Posteraro B, Romano L, Battaglia F, Lopizzo T, De Carolis E, et al. In vitro activity of *Citrus bergamia* bergamot oil against clinical isolates of dermatophytes. *J Anti Chem* 2006; 59:305-08. doi: 10.1093/jac/dkl473
22. Tabatabaeiyazdi F, Alizadehbehbahani B, Heidarishreshjani M. [The comparison of antimicrobial effects of *Chevil Ferulago angulata* extract with a variety of common therapeutic antibiotics invitro]. *J Arak Uni Med Sci* 2014; 17:35-46. (Persian)
23. Alizadehbehbahani BA, Shahidi F, Yazdi FT, Mortazavi SA, Mohebbi M. Use of *Plantago major* seed mucilage as a novel edible coating incorporated with *Anethum graveolens* essential oil on shelf life extension of beef in refrigerated storage. *Int J Bio Mac* 2017; 94:515-26. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.03.177
24. Singh N, Singh R, Bhunia A, Stroshine R. Efficacy of chlorine dioxide ozone, and thyme essential oil or a sequential washing in killing *Escherichia coli* O157 H7 on lettuce and baby carrots. *LWT Food Sci Tech* 2002; 35:720-9. doi: 10.1006/fstl.2002.0933
25. Moreira M, Ponce A, Delvalle C, Roura S. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT Food Sci Tech* 2005; 38:565-70. doi: 10.1016/j.lwt.2004.07.012

Investigation of Phytochemical Compounds, antioxidant Potential and the Antimicrobial Effect of Bergamot Essential Oil on some Pathogenic Strains Causing Infection In vitro

Noshad M^{1*}, Alizadehbehbahani B¹

(Received: November 27, 2018

Accepted: January 16, 2019)

Abstract

Introduction: Bergamot (*Citrus bergamia*) belongs to the Rutaceae family. The purpose of this study was to identify the phytochemical compounds and antioxidant activity of Bergamot essential oil as well as investigating the effect of its antimicrobial activity on some pathogenic strains causing infection using in vitro.

Materials & Methods: In this experimental study, phytochemical compounds of Bergamot essential oil were identified using gas chromatography–mass spectrometry. Antioxidant potential was evaluated by radical scavenging capacity assay (IC₅₀). The antimicrobial effect of Bergamot essential oil was tested through Kirby-Bauer, agar diffusion (well), broth microdilution susceptibility assay, and pour plate (minimum bactericidal concentration) methods.

Findings: Phytochemical analysis of the essential oil confirmed the presence of 19 constituents in Bergamot. The main constituents were Limonene (31.58%) and

Linalool (21.47%). The Antioxidant activity (IC₅₀) of Bergamot essential oil was equal to 212µg/ml. The minimum inhibitory concentration of Bergamot essential oil for *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis* and *Streptococcus pyogenes* was 4, 8, 2 and 2 mg/ml, respectively. The minimum bactericidal concentration for bacteria was 8, 8, 4 and 4 mg/ml, respectively.

Discussion & Conclusions: This study revealed the considerable inhibitory effects of Bergamot essential oil on the pathogenic strain causing infection, including Gram-positive bacteria (*Staphylococcus epidermidis* and *Streptococcus pyogenes*). Although more research is needed in this field, Bergamot essential oil can be used as a new antimicrobial agent in the pharmaceutical and food industries.

Keywords: Antioxidant potential, Bergamot essential oil, Pathogenic bacteria, Phytochemical compounds

1. Dept of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran

**Corresponding author Email: noshad@ramin.ac.ir*