BRIEF REPORT

In-Vitro Evaluation of the Antibacterial Effect of Orange Peel Extract (Citrus sinensis peel)

Majid Sadeghpour[1],
Alireza Mokhtari[2],
Maryam Gorgin[3]

[1] MSc in Microbiology, Faculty of Biology Sciences, School of Marine Science and Technology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[2] PhD in Bacteriology, Faculty of Biology Sciences, Faculty of Veterinary Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[3] MSc in Persian Language and Literature, Faculty of Language and Literature, Karaj Payam Noor University, Karaj, Iran

(Received August 14, 2016; Accepted October 29, 2016)

Abstract

Background and purpose: Intestinal bacterial infections are treated with antibiotics; but there are some reports on the effects of medicinal plants in digestive disorders. Today, medicinal herbs are more suggested due to increasing resistance of bacteria to antibiotics, people are more relying on the medicinal herbs. This study aimed to evaluate the antibacterial effect of orange peel extract.

Materials and methods: After collecting orange peel samples, the methanol extract was provided using maceration method and the effect of this extract against the standard strains of bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa,* and *Salmonella enterica*) was assessed using microdilution (well plates) in brain-heart infusion medium.

Results: In this study, all the standard strains of bacteria in wells were sensitive to the extract. Meanwhile, different minimum inhibitory concentrations (MIC) were observed in various genera. The first group (*Bacillus cereus*) was the most sensitive due to receiving MIC=3.12 µl/ml of the extract. In the second group, *Staphylococcus* and *Salmonella* were expressed as they were administered administered MIC 6.25 µl/ml of the extract. The third group (*Klebsiella* and *Pseudomonas*) was listed as the most resistant group, which received MIC=12.5 µl/ml of the extract.

Conclusion: Research on the use of natural products, which are used in traditional medicine for gastrointestinal disorders, can be valuable in terms of antibacterial activity and adjustment of microbial flora. In this study, it was demonstrated that orange peel can inhibit the growth of many bacteria *in-vitro*.

Keywords: *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumoniae*, orange peel, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*

J Mazandaran Univ Med Sci 2017; 27(147): 392-397 (Persian).

گزارش کوتاه

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و هفتم شماره ۱۴۷ فروردین سال ۱۳۹۶ (۳۹۲-۳۹۷)

بررسی اثر ضدباکتریایی عصاره هیدروالکلی پوست پرتقال [*Citrus sinensis Peel*] در شرایط آزمایشگاهی

مجید صادق‌پور[۱]
علیرضا مختاری[۲]
مریم گرگین[۳]

چکیده

سابقه و هدف: عفونت‌های باکتریایی روده‌ای با تجویز آنتی‌بیوتیک قابل‌درمان هستند؛ ولی گزارش‌هایی مبنی بر تأثیرات گیاهان دارویی در ناراحتی‌های گوارشی نیز وجود دارد که با افزایش روزافزون مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی باکتریایی، استفاده از آن‌ها را ترغیب می‌کند. هدف از این تحقیق، بررسی شدت اثر ضدباکتریایی عصاره متانولی پوست پرتقال است.

مواد و روش‌ها: پس از جمع‌آوری پوست پرتقال و شناسایی آن، عصاره متانولی با روش ماسراسیون (Maceration) تهیه شد و اثر آن علیه سویه‌های استاندارد باکتری‌های استافیلوکوک اورئوس (*Staphylococcus aureus*)، باسیلوس سرئوس (*Bacillus cereus*)، کلبسیلا پنومونیه (*Klebsiell pneumoniae*)، سودوموناس آئروژینوزا (*Pseudomonas aeruginosa*) و سالمونلا اینتریتیدیس (*Salmonella enteritidis*) با استفاده از روش میکرودایلوشن (گوده پلیت) در محیط BHI براث (Brain Heart Infusion broth) بررسی و مطالعه گردید.

یافته‌ها: همه سویه‌های استاندارد باکتری‌ها در گوده ابتدایی، حساس به این عصاره بودند؛ ولی حداقل غلظت ممانعت از رشد (Minimum Inhibitory Concentration: MIC) در جنس‌های گوناگون، متفاوت دیده شد. در گروه اول حساس‌ترین باکتری، باسیلوس سرئوس مشاهده شد؛ زیرا MIC= ۳/۱۲ µl/ml از عصاره را دریافت کرده بود. در گروه دوم جنس‌های استافیلوکوکوس و سالمونلا بیان شده‌اند؛ زیرا MIC= ۶/۲۵ µl/ml از عصاره را شامل می‌شود. در گروه سوم که جنس‌های کلبسیلا و سودوموناس هستند، مقاوم‌ترین موارد بیان شده‌اند، MIC= ۱۲/۵ µl/ml از عصاره را دریافت کرده‌اند.

استنتاج: تحقیق در مورد محصولات طبیعی که مصرف آن‌ها در طب سنتی برای ناراحتی‌های گوارشی مرسوم بوده، ازنظر فعالیت ضدباکتریایی و تنظیم فلور میکروبی باارزش است. در این پژوهش مشخص گردید که پوست پرتقال می‌تواند رشد بسیاری از باکتری‌ها را در شرایط آزمایشگاهی مهار کند.

واژه‌های کلیدی: استافیلوکوک اورئوس، باسیلوس سرئوس، پوست پرتقال (*Citrus sinensis peel*)، سودوموناس آئروژینوزا، سالمونلا اینتریتیدیس، کلبسیلا پنومونیه

مقدمه

درمان آنتی‌بیوتیکی بیماری‌های عفونی با منشأ باکتریایی، به‌دلیل مشکلاتی مانند مقاومت دارویی و بروز عوارض جانبی با مشکل مواجه است (۲،۱). از جمله نگرانی‌های عمده برای جامعه پزشکی، بیماری‌های عفونی با منشأ پاتوژن‌های مقاوم به‌ویژه باکتری‌های تولیدکننده آنزیم‌های

مولف مسئول: مجید صادق‌پور– تهران: دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشکده علوم و فنون دریایی، گروه زیست‌شناسی Email: majid_sadeghpoor@yahoo.com
۱. کارشناسی ارشد میکروب‌شناسی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران
۲. دکتری تخصصی باکتری‌شناسی، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران
۳. کارشناسی ارشد زبان و ادبیات فارسی، گروه زبان و ادبیات، دانشکده ادبیات فارسی، دانشگاه پیام نور کرج، البرز، ایران
تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۵/۲۴ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۵/۶/۲۹ تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۸/۸

بتالاکتاماز اعم از باکتری‌های مقاوم مسبب عفونت بیمارستانی یا باکتری‌های مقاوم عامل عفونت‌های کسب‌شده از جامعه می‌باشد؛ بنابراین، استفاده از فرآورده‌های گیاهی با عوارض جانبی کمتر می‌تواند کمک شایانی در درمان این نوع عفونت‌ها داشته باشد (۳). پرتقال متعلق به راسته *Sapindales* و خانواده *Rutaceae* است که در نواحی معتدل شمالی و جنوبی ایران از جمله استان گیلان و مازندران و ... کشت می‌شود. ترکیب الکاتور در پوست پرتقال برای معطرساختن شربت‌ها، لوسین‌ها و لیمونادها کاربرد فراوانی دارد (۴). Prindle و Wright اظهار داشتند اثر ترکیبات فنولیک در غلظت‌های پایین، بر فعالیت آنزیم‌هایی که در ارتباط با تولید انرژی بوده‌اند، اثر می‌گذارند. درصورتی‌که در غلظت‌های بالاتر، ترکیبات فنولیک سبب غیرطبیعی‌شدن پروتئین‌ها می‌شوند. اثر ترکیبات فنولیک بر رشد میکروب‌ها در تغییرپذیری دیواره سلولی و خروج ماکرومولکول‌ها از درون سلول مؤثر است و به نابودی میکروارگانیسم منجر می‌گردد (۶،۵). پژوهش حاضر بر روی سویه‌های استاندارد باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی که از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران (Iranian Research Organization for Science and Technology: IROST) تهیه شده، صورت گرفته است. MIC عصاره تعیین شد تا با ارزیابی آن‌ها رابطه حساسیت وابسته به دوز (Susceptible Dose Dependent: SDD) در باکتری‌های فوق به‌دست آید.

مواد و روش‌ها

پس از جمع‌آوری پرتقال تامسون از منطقه شمال کشور و جداکردن پوست تازه آن، در سایه و به دور از نور خورشید با جریان ملایم هوای در گذر، برای مدت ۷۲-۴۸ ساعت نسبت به خشک‌کردن آن‌ها اقدام شد و پس از آماده‌سازی پوست‌ها، عصاره‌گیری انجام گردید.

تهیه عصاره متانولی پوست

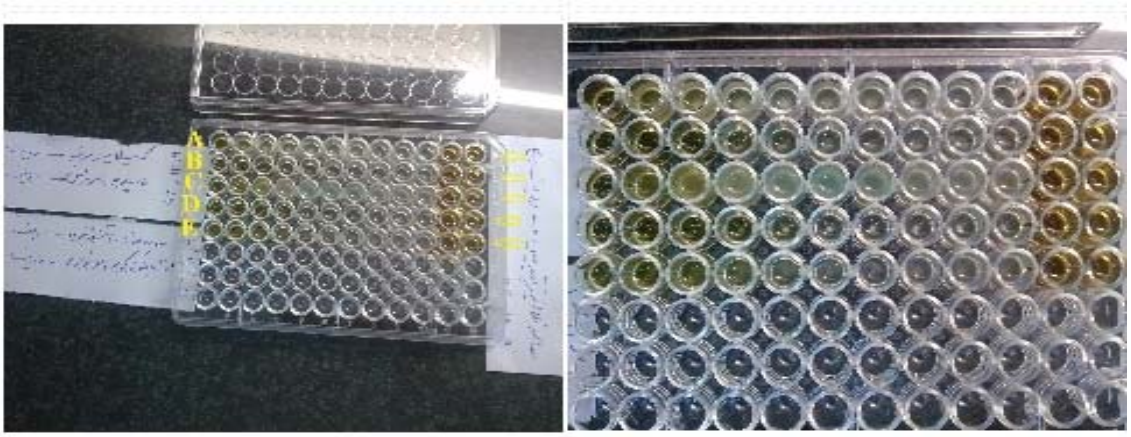
عصاره‌گیری به روش خیساندن (Maceration) صورت گرفت. مقدار g ۱۵ از پوست خشک‌شده وزن گردید و پس از نیمه‌خردشدن، در cc ۴۵۰ متانول ۸۰ درصد به مدت ۷۲ ساعت و در مکان تاریکی خیسانده شد. درنهایت، عصاره با کاغذ صافی صاف شد و پس از تغلیظ بر روی بن ماری با دمای ۴۵ تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد، در یخچال نگهداری گردید (۸،۷).

بررسی اثر ضدباکتریایی عصاره

فعالیت ضدباکتریایی عصاره با استفاده از روش گوده‌ای داخل پلیت (میکرودایلوشن) و تعیین میزان کدورت موجود ناشی از رشد باکتری در محیط BHI براث (Brain Heart Infusion broth) صورت گرفت (تصویر شماره ۱) (۱۰،۹).

تعیین میزان MIC از عصاره

برای تعیین MIC، ابتدا به هر یک از گوده‌های پلیت ۹۶ خانه، به میزان µl ۱۰۰ از محیط BHI براث با سمپلر هشت کاناله اضافه شد. سپس، از محلول عصاره پوست پرتقال به میزان µl ۱۰۰ به گوده اول از سمت چپ اضافه و به‌خوبی با محیط مخلوط گردید. بدین ترتیب، گوده شماره اول معادل µl ۵۰ از ماده مؤثره عصاره را دریافت کرد. درادامه، از گوده اول به میزان µl ۱۰۰ برداشت و به گوده دوم



تصویر شماره ۱: ممانعت از رشد عصاره پوست پرتقال در محیط BHI براث

ردیف A: کلبسیلا پنومونیه، ردیف B: باسیلوس سرئوس، ردیف C: سودوموناس آئروژینوزا، ردیف D: استافیلوکوکوس اورئوس و ردیف E: سالمونلا اینتریتیدیس

منتقل گردید. به همین ترتیب، رقت ½ از عصاره در هر گوده تهیه و درنهایت از گوده دهم، ۱۰۰ µl عصاره خارج شد (۱۲-۱۰). سوسپانسیون میکروبی از باکتری‌های استافیلوکوک اورئوس (*Staphylococcus aureus*)، باسیلوس سرئوس (*Bacillus cereus*)، سودوموناس آئروژینوزا (*Pseudomonas aeruginosa*)، کلبسیلا پنومونیه (*Klebsiell pneumoniae*)، و سالمونلا اینتریتیدیس (*Salmonella enteritidis*) تهیه گردید و در هر ردیف افقی استفاده شد. به هریک از گوده‌ها به میزان ثابت ۱۰۰ µl از سوسپانسیون میکروبی اضافه شد تا حجم نهایی محلول در هر گوده، با ۲۰۰ µl برابر با غلظت‌های متفاوت عصاره گردد. گوده‌های ۱۱ و ۱۲ عاری از محلول عصاره بودند. گوده ۱۱ محتوی ۱۰۰ µl محیط کشت و ۱۰۰ µl سوسپاسیون میکروبی به‌عنوان کنترل مثبت یا GC (Growth control) و گوده ۱۲ که فقط محتوی محیط کشت بود، به‌عنوان کنترل منفی یا SC (Sterility control) درنظر گرفته شدند. درپایان، پلیت‌ها در گرمخانه با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند. پس از اتمام گرمخانه‌گذاری، گوده‌های شفاف و بدون کدورت (بدون رشد) بررسی شدند (۱۴،۱۳). همه مرحله‌های آزمایش مطابق پیشنهاد و دستورالعمل مندرج در راهنمای عملکرد مؤسسه استاندارد آزمایشگاهی و بالینی (Clinical and Laboratory Standards Institute) صورت گرفت (۱۶،۱۵،۹).

یافته‌ها و بحث

خاصیت ضدمیکروبی عصاره با غلظت تام در برابر رشد باکتری‌ها در جدول شماره ۱ مشاهده می‌شود.

Anagnostopoalou در سال ۲۰۰۴ خواص آنتی‌اکسیدانی فراکسیون ماده اتیل استات پوست میانی پرتقال را در ناحیه جنوبی مصر گزارش نمود. این ترکیبات از نوع فلاونوئیدها مثل فلاونول‌ها و اسیدهای فنولیک بودند (۶). شناخت دقیق خواص درمانی و کاربرد انواع محصولات

جدول شماره ۱: سوش‌های باکتری‌های استاندارد

	PTCC	گروه‌بندی	توضیح
باسیلوس سرئوس	۱۰۱۵	گروه اول	ردیف B– کدورت از گوده شماره ۵، MIC=۳/۱۲ µl
استافیلوکوک اورئوس	۱۱۱۲	گروه دوم	ردیف D– کدورت از گوده شماره ۴، MIC=۶/۲۵ µl
سالمونلا اینتریتیدیس	۱۷۸۷		ردیف E– کدورت از گوده شماره ۴، MIC= ۶/۲۵ µl
کلبسیلا پنومونیه	۱۲۹۰	گروه سوم	ردیف A– کدورت از گوده شماره ۳، MIC= ۱۲/۵ µl
سودوموناس آئروژینوزا	۱۳۱۰		ردیف C– کدورت از گوده شماره ۳، MIC= ۱۲/۵ µl

PTCC: Persian Type Culture Collection

طبیعی و گیاهان دارویی موجود در کشور پهناور ایران، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. اغلب اسانس‌ها و عصاره‌ها به‌عنوان منبع ترکیبات ضدمیکروبی از گیاهان خاص و بومی منطقه تأمین می‌شود (۱۶).خالص‌سازی اجزا و ترکیبات مؤثره پوست پرتقال با ماده مؤثره دی‌کلرومتان در شرایط *in vivo* و *in vitro*، در کنترل و پیشگیری از عفونت‌های مزمن گوارشی و کاهش آب بدن به‌دنبال موارد اسهالی، بسیار ارزشمند است. در این پژوهش، مشخص شد که پوست پرتقال می‌تواند رشد بسیاری از باکتری‌ها را در شرایط آزمایشگاهی مهار کند.

محصولات طبیعی که مصرف آن‌ها در طب سنتی برای بهبود ناراحتی‌های گوارشی مرسوم بوده است، از نظر فعالیت ضدباکتریایی و تنظیم فلور میکروبی با ارزش می‌باشند. این پژوهش نشان داد که پوست پرتقال می‌تواند رشد بسیاری از باکتری‌ها را در شرایط آزمایشگاهی مهار کند.

سپاسگزاری

این مقاله از تحقیق آزمایشگاهی میکروبیولوژی استخراج شده است. بدین‌وسیله از کلیه عزیزانی که در انجام این فعالیت علمی راهنمایی مفید و ارزنده داشتند قدردانی و تشکر می‌گردد.

References

1. Behzadnia S, Davoudi A, Rezai MS, Ahangarkani F. Nosocomial infections in pediatric population and antibiotic resistance of the causative organisms in north of iran. Iran Red Crescent Med J. 2014; 16(2):e14562.
2. Askari E, Soleymani F, Arianpoor A, Tabatabai SM, Amini A, Naderi Nasab M. Epidemiology of mecA-methicillin resistant Staphylococcus aureus in Iran: A systematic review and meta-analysis. Iran J Basic Med Sci. 2012; 15(5):1010-1019 (Persian).
3. Eslami G, Rezai MS, Salehifar E, Rafiei A, Rafati MR, Shafahi K. Epidemiology of Extended Spectrum Beta Lactamases Producing E. coli Genes in Strains Isolated from Children with Urinary Tract Infection in North of Iran .J Mazandaran Univ Med Sci .2016; 25(132): 270-279 (Persian).
4. Ebrahimi SN, Hadian J, Mirjalili M, Sonboli A, Yousefzadi M. Essential oil composition and antibacterial activity of Thymus caramanicus at different phenological stages. Food Chem.

2008; 110(4):927-931.

5. Kouidhi B, Al Qurashi YMA, Chaieb K. Drug resistance of bacterial dental biofilm and the potential use of natural compounds as alternative for prevention and treatment. Microb Pathog. 2015; 80:39-49.
6. Anagnostopoulou MA, Kefalas P, Kokkalou E, Assimopoulou AN, Papageorgiou VP. Analysis of antioxidant compounds in sweet orange peel by HPLC–diode array detection–electrospray ionization mass spectrometry. Biomed Chromatogr. 2005; 19(2):138-148.
7. Chakraborty M, Mitra A. The antioxidant and antimicrobial properties of the methanol extract from Cocosnuciferamesocarp. Food Chem. 2008 ؛107(3): 994–999.
8. Davidson PM, Sofos JN, Branen AL. Antimicrobials in food. Boca Raton: CRCpress, Taylor & Francis, (2005).p 245-256.
9. Mahon CR, Lehman DC, Manuselis Jr G. Textbook of diagnostic microbiology. 19th ed: Elsevier Health Sciences; 2014.p: 313-320.
10. Zargari A. Medicinal plants. Tehran University Pub: 1997: 485-488 (Persian).
11. Betty A F, Sahm D. Bailey & Scott's diagnostic microbiology .12th edition, 2007. Mosby.p 736-749.
12. Schwalbe R, Steele-Moore L, Goodwin AC. Antimicrobial susceptibility testing protocols. Boca Raton: Crc Press; 2007:82-95.
13. Basu A, Garg P, Datta S, Chakraborty S, Bhattacharya T, Khan A, et al. Vibrio cholerae O139 in Calcutta, 1992-1998: incidence, antibiograms, and genotypes. Emerg Infect Dis. 2000; 6(2):139-147.
14. Hall GS. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 13th ed.Lab Medicine. 2013; 44(4): 436.
15. Patel J, Cockerill F, Alder J, Bradford P, Eliopoulos G, Hardy D. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fourth informational supplement. CLSI standards for antimicrobial susceptibility testing. 2014; 34(1):1-226.
16. Rahnama M, Najimi M, Ali S. Antibacterial effects of Myristica fragrans, Zataria multiflora Boiss, Syzygium aromaticum, and Zingiber officinale Rosci essential oils, alone and in combination with nisin on Listeria monocytogenes. Comparative Clinical Pathology. 2012; 21(6):1313-1316.