

بررسی اثر رقت های مختلف آب میوه مرکبات گونه *Citrus medica* L. (بادرننگ) علیه باکتری های بیماری زای انسانی

محدثه شجاعی مهر^۱، سنبلی ناظری^{۲*}

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی بوعلی سینا، همدان. ۲- استادیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا، همدان.

*نویسنده مسئول

چکیده

پدیده مقاومت آنتی بیوتیکی باکتریایی به چالشی برای درمان بیماری های مختلف تبدیل شده است به طوری که نیاز به جستجوی مداوم برای یافتن عوامل ضد میکروبی جدید و با قدرت بیشتر وجود دارد. اثر آنتی باکتریایی عصاره بسیاری از گیاهان دارویی، که کاربرد زیادی در طب سنتی و درمان بیماریها دارند، شناخته شده است. میوه های خانواده مرکبات اسیدی و حاوی ترکیبات مغذی سالم هستند. حضور فلاونوئیدها (با خاصیت آنتی باکتریال شناخته شده) در آب مرکبات به دلیل اثرات بیولوژیکی و فیزیولوژیکی مهم توجه پژوهشگران را به خود جلب کرده است. در این تحقیق فعالیت ضد باکتری آب میوه *C. medica* در برابر نه ایزوله ی بالینی باکتریایی شامل: *Bacillus cereus*، *Bacillus subtilis*، *Streptococcus pyogenes*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Micrococcus aureus*، *Salmonella typhi*، *Staphylococcus aureus*، *Enterobacter aerogenes* و *Escherichia coli* مورد بررسی قرار گرفت. اثرات ضد باکتری با روش تست آنتی بیوگرام ۲ در روش رقت لوله ای ۳ انجام شد. نتایج نشان داد آب میوه بادرنگ در مقابل همه باکتری های مورد آزمون فعالیت های ضد باکتریایی دارد. کلمات کلیدی: بادرنگ، آب میوه، خاصیت آنتی باکتریالی، رقت لوله ای

مقدمه

امروزه پدیده مقاومت به آنتی بیوتیک های مصرفی در درمان بیماری های مختلف تبدیل شده است. به همین دلیل یافتن ترکیبات جدید با ویژگی باکتریایی مناسب در اولویت تحقیقات پزشکی قرار گرفته است. کشف ترکیباتی با خاصیت آنتی بیوتیکی از گیاهان دارویی، سبب استفاده روز افزون از این منابع برای درمان بیماریها شده است (اوجیزه و همکاران، ۲۰۱۱). این گیاهان، نسبت به داروهای متعارف، به راحتی در دسترس و ارزان هستند (آی بینو و همکاران، ۲۰۰۷). گیاهان دارویی به تنهایی و یا به صورت ترکیبی در درمان بیماری های مختلف به وفور استفاده شده اند. میوه های خانواده مرکبات و آب آن ها عمدتاً شامل فلاون ها و فلاونوئیدها هستند. حضور فلاونوئیدها، اسید اسکوربیک، توکوفرول ها، و اسید Antibacterial Antibiogram dilution method سیتریک در عصاره ها و آب میوه مرکبات نشان داده شده است. در اوایل دهه نود، اثرات بیولوژیک و دارویی فلاونوئیدهای موجود در آب مرکبات به اثبات رسیده است (ال آنی و همکاران، ۲۰۱۰). مرکبات متعلق به خانواده Rutaceae و زیر خانواده Aurantioidae هستند. در ایران *Citrus medica* (بالنگ یا بادرنگ) در ناحیه شوش باستان وجود داشته است (فتوحی و فتاحی مقدم، ۱۳۸۵). *C. medica* درختی کوچک، با میوه بزرگ (به طول ۲۰-۲۲٫۵ سانتی متر) شبیه آناناس است. پوست بالنگ به عنوان دسر خوش عطر استفاده میشود. در هند، پوست این گیاه برای درمان اسهال خونی و غلبه بر بوی بد دهان استفاده میشود. *C. medica* در درمان دیابت و بیماری آلزایمر کاربرد دارد و از اسانس پوست آن به عنوان یک آنتی بیوتیک استفاده می شود. آب مرکبات حاوی ماده فعال که آنها را واجد شرایط برای استفاده دارویی میکند (آد دجی و همکاران، ۲۰۰۷). در نیجریه آب لیمو برای سرعت دهی به بهبود زخم ها و بریدگی ها استفاده میشود (واکر، ۱۹۹۵).

مواد و روش‌ها

میوه بادرنگ از شمال ایران زیر نظر کارشناس سازمان تحقیقات مرکبات کشور واقع در رامسر در دی ماه جمع آوری شد. نمونه‌ها با آب مقطر استریل شسته شده و پوست آنها گرفته شد. هسته‌های آن خارج شد و به وسیله دستگاه آب میوه گیری استریل آب آن گرفته شد و تا زمان استفاده در ظروف شیشه‌ای در فریزر نگه داری شد. آب میوه در میکرو تیوپ‌های استریل 2ml ریخته شد و با دور ۱۵۰۰۰rpm به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴°C سانتریفیوژ شد و مایع رویی جدا گردید. pH آن توسط pH متر اندازه گیری شد. برای تهیه محیط کشت باکتری از نمونه‌های باکتری یک تک کلونی بر روی محیط جامد نوترین آگار منتقل و برای مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید. سپس با استفاده از کلونی‌های حاصل از کشت بر روی این محیط، سوسپانسیونی از باکتری با غلظتی معادل نیم مک فارلند در محیط نوترین براث در لوله آزمایش تهیه گردید و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور و دمای ۳۷°C شیک شد. برای انجام آزمایش از ۶ لوله آزمایش برای هر تیمار استفاده شد. برای تهیه سریال‌های رقتی، ۱۹۰ میکرولیتر از محیط کشت نوترین براث داخل هر کدام از لوله‌ها ریخته شد. سپس به لوله اول ۱۰۰ میکرولیتر آب میوه اضافه گردید. پس از آن ۱۰۰ میکرولیتر از همین لوله به لوله آزمایش دوم و به همین ترتیب تا لوله ششمی انتقال داده شد و در نهایت از لوله ششم ۱۰۰ میکرولیتر خارج شد تا رقت‌های سریالی یک سوم برای هر لوله بدست آید. نهایتاً ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری (با غلظت نیم مک-فارلند) به لوله‌ی آزمایش اضافه شد. مخلوط محیط کشت نوترین براث و ۱۹۰ میکرو لیتر عصاره به لوله شاهد منفی و محیط نوترین براث بدون عصاره و ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری به لوله شاهد مثبت اضافه گردید. سپس لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. حداقل رقت بازدارندگی با بررسی کدورت حاصل از رشد باکتری، ثبت شد. برای سنجش حداقل رقت کشندگی، ۵ میکرولیتر از لوله‌هایی که در آن‌ها کدورت ناشی از رشد باکتری مشاهده نشده بود به پلیت‌های حاوی محیط کشت نوترین آگار انتقال داده شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار داده شدند. پس از این زمان پلیت‌ها از نظر رشد باکتری ارزیابی شدند. حداقل رقتی که در آن هیچ باکتری بر روی پلیت رشد نکرده بود به عنوان حداقل رقت کشندگی در نظر گرفته شد. آزمایشات در دو تکرار انجام پذیرفت.

نتایج و بحث

در این بررسی PH آب میوه اندازه گیری شد و در محدوده ی ۳ مشخص گردید. خواص آنتی باکتریال آب میوه بر روی باکتری های گرم مثبت و گرم منفی در جدول یک آورده شده است. بیشترین اثر ضد باکتریایی آب میوه روی باکتری *Bacillus subtilis* و *Salmonella typhi* مشخص گردید و کمترین آن بر روی باکتری *Escherichia coli* و *Micrococcus aureus* دیده شد. کمترین رقت بازدارندگی آب میوه مربوط به باکتری *Bacillus subtilis* و کمترین رقت کشندگی مربوط به *Bacillus subtilis*، *Entrobacter aerogenes*، *Salmonella typhi* است. این نتایج طیف گسترده ای از فعالیت ضد میکروبی آب میوه را نشان می دهد. فعالیت ضد میکروبی آب میوه *Citrus medica* در برابر هفت باکتری از روش انتشار دیسک نشان داده شد (آرچانا و همکاران، ۲۰۱۱). آی بینو و همکاران (۲۰۰۷) اثر آب میوه *Citrus Aurantifolia* را بر روی پاتوژن های بیماری زای انسانی بررسی کردند که در بین باکتریها، *Staphylococcus aureus* بهترین اثر بازدارندگی را داشت. همچنین اوپوه و همکاران (۱۹۹۵) اثر ضد میکروبی آب *C. aurantifolia* را در مقابل برخی از باکتری های گرم منفی و گرم مثبت گزارش کردند. پاتاک و همکاران (۲۰۱۲) فعالیت ضد باکتری آب میوه چندین گونه از مرکبات مانند *Citrus reticulata*، *C. limon* و *C. limon* و گونه انار *P. granatum* را بررسی کردند و بالاترین فعالیت ضد باکتری آب میوه مربوط به *C. limon* دانستند و آب میوه *C. reticulata* و *C. paradisi* حداقل فعالیت ضد باکتری را دارند. (پاتاک و همکاران، ۲۰۱۲). در مطالعه دیگری رودریگز و همکاران (۲۰۰۰) فعالیت ضد میکروبی آب میوه لیمورا مورد بررسی قرار دادند و دریافتند آب میوه لیمو فعالیت ضد میکروبی بالایی دارد.

جدول ۱- مقادیر حداقل رقت بازدارندگی و حداقل رقت کشندگی آب میوه C.medica (بادرننگ) علیه باکتری‌های تست شده در روش رقت لوله‌ای.

حداقل رقت کشندگی آب میوه (میکرولیتتر)	حداقل رقت بازدارندگی آب میوه (میکرولیتتر)	باکتری
Gram-Positive Organisms:		
1/13 *	1/40 *	Staphylococcus aureus
1/81	1/243	Bacillus subtilis
-	1/81	Bacillus cereus
1/27	1/81	Streptococcus pyogenes
Gram-Negative Organisms:		
1/9	1/9	Escherichia coli
1/01	1/122 *	Salmonella typhi
1/3	1/81	Pseudomonas aeruginosa
1/81	1/81	Enterobacter aerogene
1/4 *	1/4 *	Micrococcus aureus

-: هیچ گونه اثر کشندگی مشاهده نشد و همه باکتریهای ممانعت شده رشد کردند. *: میانگین نتایج دو تکرار.

منابع

فتوحی فزونی. ر و فتاحی مقدم، ج. ۱۳۸۵. پرورش مرکبات در ایران. ویرایش دوم. دانشگاه گیلان. ص ۳۰۵

- Adedeji, G.B., Fagade, O.E. and Oyelade, A.A. 2007. Prevalence of *Pseudomonas aeruginosa* in Clinical Samples and its sensitivity to Citrus Extract. *African Journal of Biomedical Research*. 2(10):183-187.
- Aibinu, I., Adenipekun, T., Adelowotan, T., Ogunsanya, T. and Odugbemi, T. 2007. Evaluation of the antimicrobial properties of different parts of *Citrus aurantifolia* (Lime fruit) as used locally. *Afr. J. Trad. CAM*. 4:185-190.
- Al-Ani, W.N., Al-Haliem, S.M., Tawfik, N.O. 2010. Evaluation of the Antibacterial Activity of Citrus Juices: An In Vitro Study. *Al-Rafidain Dent J*. 2(10).
- Archana, S.N., Vijay, J., Anand, M. 2011. Antimicrobial Activity of Six Different Parts of the Plant *Citrus medica* Linn. *Pharmacognosy Journal*. 21(1):80.
- Pathak, A.N., Bose, D., Sharma, P. 2012. Antimicrobial activity of citrus fruit juices. LAP LAMBERT Academic Publishing. 104 pages.
- Oboh, P.A., Agbonlahor, D. E., Ekundayo A.O., Owhe-Urughe, U.B. 1995. Antibacterial activity of *Citrus aurantifolia* (Lime) juice against some Gram positive and Gram negative bacteria. *Nig. Ann. Nat. Sci*. 2: 1-9.
- Ojiezeh, T. I., Nwachukwu, S. E and Udoh, S. J. 2011. Antimicrobial effect of *Citrus aurantifolia* juice and *veronica amygdalina* on common bacteria isolates. *Der Pharma Chemica*. 3(1): 1-7.
- Rodriguez, A., Sandstrom, A., Ca, T., Steinsland, H., Jensen, H., Aaby, P. 2000. Protection from Cholera by adding lime juice to food—results from community and laboratory studies in Guinea-Bissau, West Africa. *Trop Med Intern Hlt*. 5(6):418–422.
- Walker, A. R. 1953. Usages Pharmaceutiques des plantes spontanées du Gabon. *Bulletin de l'Institut d'études centrafricaines*. nouvelle série. 5: 19-40.

The investigation of the effect of different dilution *Citrus medica* L. juice against human pathogenic bacteria

M. Shojaemehr¹, S. Nazeri^{2*}

1- Dept. of Biotechnology Sciences, Bu-Ali Sina University, Hamedan- Iran. 2- Dept. of Biotechnology Bu-Ali Sina University, Hamedan- Iran.

*Corresponding author

Abstract

Antibiotic bacterial resistance has become a challenge for curing different diseases. For this reason there is an urgent need for finding new and more powerful antimicrobial agents. The antibacterial effect of the extract of many herbs which are widely used in traditional medicine and treatment of the diseases has been widely known. Citrus fruits are acidic and have healthy nutritious ingredients. The presence of flavonoids (with their well-known antibacterial effect) in the juice of citrus fruits has attracted the attention of many researchers due to their biological and physiological effects. In this study, the antibacterial activity of *C. medica* juice against nine isolates of bacteria including *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus aureus*, and *Escherichia coli* was examined. The antibacterial effects were measured by AntibioGram method using tube dilution technique. The results showed that *C. medica* juice had antibacterial activity against the tested bacteria.

Keywords: *Citrus medica*, juice, antibacterial activity, dilution method