

بررسی نقش ضد باکتریال اسانس پرتقال بر روی باکتریهای هوازی و بی‌هوازی اختیاری

در بیماران مبتلا به ضایعات پوستی

سعید مینوئی*^۱، گیتا اسلامی^۲، داریوش مینایی تهرانی^۳ و الهام تیموری^۲

^۱ تهران، دانشگاه شهید بهشتی، پژوهشکده علوم محیطی، گروه آلاینده های محیطی

^۲ تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، گروه میکروبیولوژی

^۳ تهران، دانشگاه علوم زیستی، آزمایشگاه پژوهش زیستی

تاریخ پذیرش: ۸۵/۱۱/۱۸

تاریخ دریافت: ۸۵/۸/۱۷

چکیده

این تحقیق بر اساس افزایش روزافزون مقاومت نسبت به آنتی بیوتیکها و فقدان خط درمانی مناسب جهت درمان عفونتها انجام شد. مطالعه توصیفی در سال ۱۳۸۴ در مراکز درمانی دانشگاهی تحقق یافت. نمونه برداری از ۱۰۰ بیمار مبتلا به ضایعات پوستی با سواب و سرنگ استریل بعمل آمد و به محیط تریپتی کیز سوی برات منتقل شد. جهت بررسی باکتریها از نظر هوازی-بی هوازی اختیاری، آنها در محیطهای بلاد آگار - مک کانکی - نوترینت آگار - آگار شکلاتی و بایل اسکولین آگار کشت و سپس در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد بمدت ۲۴-۴۸ ساعت قرار داده شد. پس از تشکیل کلنی، از کلنیهای مشکوک لام تهیه شد و علاوه بر رنگ آمیزی و تعیین گرم مثبت یا منفی بودن باکتری، از تستهای افتراقی و تکمیلی نیز استفاده شد. اثر آنتی بیوتیکهایی از قبیل اریتروماسین، پنی سیلین، کلوگزاسیلین، جنتامایسین، توبرامایسین، سیپروفلوکساسین، سفنازیدیم و آمیکاسین بررسی و با اسانس خالص پرتقال مقایسه شد. نتایج نشان داد که اثر اسانس خالص پرتقال معادل آنتی بیوتیکهای فوق در مورد ۷۰ درصد از کوکسی های گرم مثبت جدا شده بود (حساس بودند). ۱۰ درصد از کوکسی های گرم مثبت نیمه حساس و ۲۰ درصد مابقی مقاوم بودند. از باسیلهای گرم منفی متعلق به خانواده انتروباکتریاسه، ۱۰ درصد حساس، ۱۰ درصد نیمه حساس و ۸۰ درصد نسبت به اسانس خالص پرتقال مقاوم می باشند. با توجه به نتایج تحقیق و پس از بررسی عوارض احتمالی اسانس در پروژه ای دیگر، می توان از اسانس خالص پرتقال به عنوان یک ماده ضد عفونی کننده در سطح ضایعات پوستی استفاده نمود.

واژه های کلیدی: اسانس پرتقال، ضایعات پوستی، عفونت، ویتامین ث

* نویسنده مسئول، تلفن تماس: ۲۹۹۰۲۸۶۷، پست الکترونیک: saeedminoui@yahoo.com

مقدمه

می تواند جایگزین مناسبی برای داروهای شیمیائی دیگر باشد که زمینه کاربردی یکسانی را با این اسانس دارند. میکرو ارگانیزمهای شایع مستقر در پوست شامل باسیلهای ديفتريوئيد، باکتریهای هوازی و بی هوازی مانند *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* (*Staphylococcus epidermidis*) گاهی *استافیلوکوک اورئوس* (*Staphylococcus aureus*) و رده های پپتواسترپتوکوکوس

شیوع فراوان ضایعات پوستی در ایران و نیاز به داروهایی با عوارض جانبی و تداخلات دارویی کمتر و اثرات درمانی بالاتر و همچنین مقاومت تعدادی از باکتریهای مولد این ضایعات به درمانهای آنتی بیوتیکی و با توجه به سمیت و عوارض جانبی داروهای مصرفی، دلیل انجام تحقیق حاضر است. استفاده از اسانس پرتقال با توجه به ماده اولیه ارزان قیمت آن که بومی ایران نیز می باشد و روش تهیه آسان آن

مواد و روشها

روش تحقیق مطالعه حاضر، توصیفی بوده و افراد مورد مطالعه شامل ۶۰ بیمار مبتلا به عفونتهای پوستی بودند که به مراکز درمانی دانشگاهی مراجعه نمودند. از افراد مبتلانی که حداقل بمدت ۳ روز آنتی بیوتیک مصرف نکرده بودند پس از پاکسازی سطح ضایعات توسط سواب یا سرنگ استریل از انتها یا حاشیه ضایعات نمونه برداری و به محیط کشت تیرپیتی کیز سوی برات برده شد. نمونه‌ها در آزمایشگاه و بمدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت. پس از گذشت این مدت از نمونه‌ها لام تهیه و رنگ آمیزی گرم شد. پس از مشاهده میکروسکوپی جهت تشخیص *انتروباکتریاسه* از محیط انوزین متیلن بلوآگار - سه قندی TSI (تریپل شوگر آیرون آگار) - سیمون سیرتات - اوره برات - لاکتوز برات و اندول استفاده شد. جهت تشخیص *استافیلوکوک*، از باکتری مشکوک در محیط مانیتول سالت آگار، تست کواگولاز انجام گرفت و نمونه جهت تشخیص *استرپتوکوک* در محیط بلاد آگار حاوی خون گوسفند کشت داده شد. پس از تشکیل کلنیها با مشاهده پیگمان آنها و همولیز و تغییر رنگ در محیطهای تشخیص افتراقی، باکتری مورد نظر شناسائی و جهت تمایز میکروکوکاسیه از تست کاتالاز استفاده شد که در مورد *استافیلوکوک*، مثبت و در مورد *استرپتوکوک* منفی بود. بدین ترتیب باکتریهای مورد نظر مربوطه شناسائی و نگهداری شدند.

اسانس گیری پرتقال: استخراج به کمک حلال آلی انجام شد، به این ترتیب که پس از شستشوی پرتقالها با استفاده از یک رنده تیز اقدام به جداسازی پوسته نارنجی رنگ روئی پرتقال شد. پس از آن پوسته های رنده شده در داخل چند شیشه جمع آوری و روی آنها حلال اتردیپترول ریخته شد تا حدی که چند سانتیمتر بالای سطح پوسته ها قرار گیرد. سپس با استفاده از دستگاه تقطیر روتاری

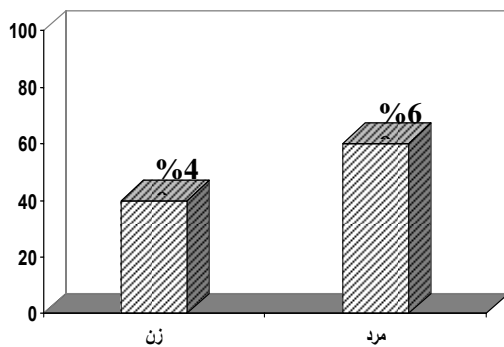
(*Streptococcus*) و *انتروکوکهای* (*Enterococcus*) مثل *استرپتوکوک فکالیس* (*Streptococcus faecalis*) و در نهایت باسیلهای کلی فرم گرم منفی و *آسیتوباکتر* (*Acinetobacter*) است. در اغلب موارد قارچها و مخمرها نیز در چینهای پوستی مستقر هستند (۲ و ۳).

از نظر ترکیبات شیمیایی، پرتقال منبع غنی ویتامین C می باشد. در پوست پرتقال، اسانسی یافت می شود که شامل دی لیمونن ($C_{10}H_{16}$) و دسایکلیک آلدئید که خاصیت ضد میکروبی داشته و همچنین مواد دیگری که شامل لینالول و دی ال - تربی نئول، تعدادی فلاونوئیدها (با اثر ضد سرطان) به نام نئوهسپیریدین، هسپیریدین، نارنگین، تانژرتین، اورانتین (Aurantin)، نوبیلتین (Nobiletin) ویتامین E، کومارینها - کارتنوئیدها و پکتین (pectin) نیز می باشد (۸). اسانس روغنی فراری که از گلهای آن گرفته می شود به اسانس نرولی معروف است و اسانسی که از برگ و سر شاخهها گرفته می شود، اسانس پتی گرین نامیده می شود. در برگهای آن مواد ال - استاچیدرین (Stachydrine) و گلیکوزید (Glycoside) و هسپیریدین (Hesperidine) وجود دارد.

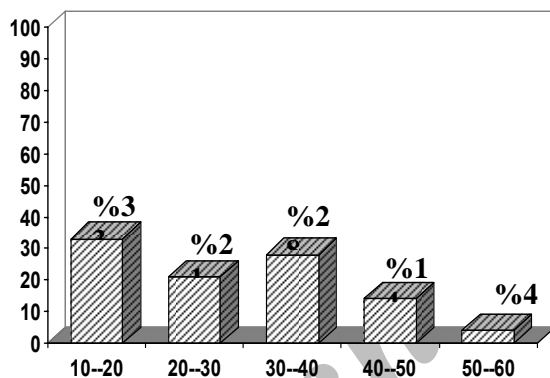
یکی از عوامل مهم مهار کننده سرطان در میوه پرتقال ویتامین C است. این ویتامین دشمن نیرومندی برای عامل سرطان زای معروفی بنام نیتروزامین می باشد. پرتقال ضد عفونتهای ویروسی است (۹). محققان خاصیت عصاره پرتقال را نه فقط مدیون ویتامین C موجود در آن بلکه مدیون وجود یک ترکیب ناشناخته آنتی میکروبیال قوی در عصاره پرتقال نیز می دانند. دانشمندان دیگری در تحقیقات خود دریافته اند که پوست پرتقال به از بین بردن باکتریها و قارچها نیز کمک می کند و در کاهش کلسترول مؤثر است (۱، ۲ و ۴).

در طب سنتی از عصاره بسیاری از گیاهان جهت درمان عفونتهای قارچی استفاده می شد که خاصیت ضد قارچی برخی از آنان به اثبات رسیده است.

آکنه ۳ درصد - و تاول ۱۲ درصد بودند. ۴۸ درصد از باکتری های جدا شده از ضایعات پوستی، باکتری های هوازی - بی هوازی اختیاری بودند. این باکتریها از نظر درصد فراوانی عبارت بودند از:



شکل ۱. درصد نتایج حاصل از بررسی جنس بیماران مبتلا به عفونتهای پوستی.



شکل ۲. درصد نتایج حاصل از بررسی سن بیماران مبتلا به عفونتهای پوستی

۳۲ درصد استافیلوکوکوس اورئوس (*Staphylococcus aureus*) - ۱۷ درصد استرپتوکوک بتاهمولیتیک گروه A (*Streptococcus*) - ۱۷ درصد اشیریشیاکلی (ایکولای) (*Escherichia coli*) - ۹ درصد استافیلوکوک کوآگولاز منفی (*Staphylococcus*) - ۸ درصد پseudomonas آئروژینوزا (*Pseudomonas aeruginosa*) - ۶ درصد انتروکوک (*Enterococcus*) - ۶ درصد انتروباکتر (*Enterobacter*) - ۳ درصد کلبسیلا (*Klebsiella*) و ۲ درصد آسیتوباکتر (*Acinetobacter*) (شکل ۳). تست آنتی بیوگرام

(Rotary evaporator) در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد اسانس و حلال از یکدیگر جدا شد (۶).

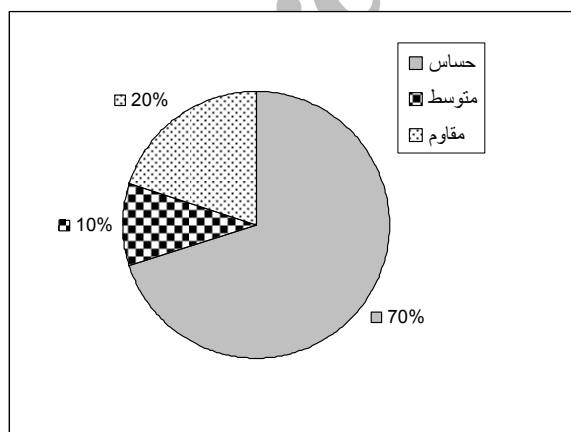
آنتی بیوگرام: جهت شناسائی خاصیت آنتی باکتریال اسانس پرتقال از دیسک بلانک، کاملاً آغشته به اسانس خالص استفاده شد. بدین منظور دیسک بطور کامل در اسانس غوطه ور گردید. برای تلقیح نمونه از یک سواب کتانی استفاده و پس از آغشته کردن آن به سوسپانسیون میکروبی، تمام سطح مولر هیتتون آگار و در جهات مختلف آن آغشته گردید. سپس دیسکهای آنتی بیوتیکی و دیسک بلانک بوسیله dispenser و یا در شرایط استریل و با پنس روی محیط قرار گرفت، سپس پلیت را برگردانده و در ۳۵ درجه سانتی گراد بمدت ۱۸-۱۶ ساعت انکوبه گردید. دیسک بلانک به روش disk diffusion در کنار سایر دیسکهای آنتی بیوتیکی قرار داده شد و پس از گذشت مدت زمان لازم، پلیت ها را روی یک سطح تیره که نور را منعکس نمی کند قرار داده و در حضور نور مناسب قطر هاله های ایجاد شده با خط کش اندازه گیری گردید. آنتی بیوتیکهای مورد مطالعه شامل اریترومايسين، پنی سیلین، کلوزاسیلین، جنتامایسین، تویرامایسین، سیپروفلاکاسین، سفتازیدیم و آمیکاسین بودند.

نتایج و بحث

بیماران مورد مطالعه، ۴۰ درصد زن و ۶۰ درصد مرد و طیف سنی بین ۶۰-۱۰ سال بود (شکل ۱). از نظر سنی، ۳۳ درصد در محدوده سنی ۱۰-۲۰ سال، ۲۱ درصد در محدوده سنی ۲۰-۳۰ سال، ۲۸ درصد در محدوده سنی ۳۰-۴۰ سال، ۱۴ درصد در محدوده سنی ۴۰-۵۰ سال و ۴ درصد در محدوده سنی ۵۰-۶۰ سال قرار داشتند. بدین ترتیب بیشترین عارضه پوستی در بین سنین ۱۰-۲۰ سال و کمترین آن در سنین ۶۰-۵۰ سال مشاهده شد. (شکل ۲).

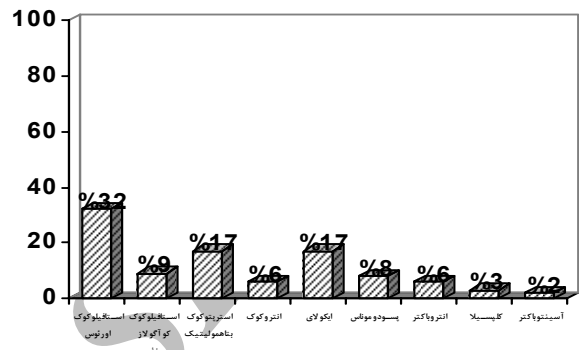
ضایعات پوستی که از آنها نمونه برداری به عمل آمد شامل آبسه ۳۴ درصد- زخم ۴۱ درصد- پوستچول ۱۰ درصد -

در این مطالعه مشخص شد که ۴۸ درصد باکتریهای موجود در ضایعات را باکتریهای هوازی و بی هوازی اختیاری و در میان آنها بالاترین درصد باکتریهای ایجاد کننده را *استافیلوکوک اورئوس* بخود اختصاص می دهد. بهترین جواب آنتی بیوتیکی را سفتری زوکسیم، سفنازیدیم و سیپروفلوکساسین به کل باکتریهای جدا شده نشان داد (شکل ۴). در مقایسه، اسانس خالص پرتقال جوابی معادل آنتی بیوتیکهای فوق در مورد ۷۰ درصد از کوکسیهای گرم مثبت جدا شده داشت و در مورد ۱۰ درصد سایر کوکسیهای گرم مثبت جواب نیمه حساس و مشابه تویرامایسین، کلوزاسیلین و اریترومایسین بود و ۲۰ درصد دیگر کوکسیها جوابی مشابه جنتامایسین و پنی سیلین داشتند یعنی مقاوم به اسانس بودند (شکل ۵). در مورد باسیلهای گرم منفی متعلق به خانواده *انتروباکتریاسه*، ۱۰ درصد حساس به اسانس خالص پرتقال بودند یعنی عملکردی مشابه سفتری زوکسیم و سیپروفلوکساسین داشتند. ۱۰ درصد دیگر از باکتریهای متعلق به این خانواده نیمه حساس به اسانس بودند و مابقی مقاومت کامل نشان می دادند (شکل ۶). نتایج فوق نشان دهنده حساسیت کوکسیهای گرم مثبت بخصوص *استافیلوکوک کوآگولاز* به اسانس پرتقال می باشد.

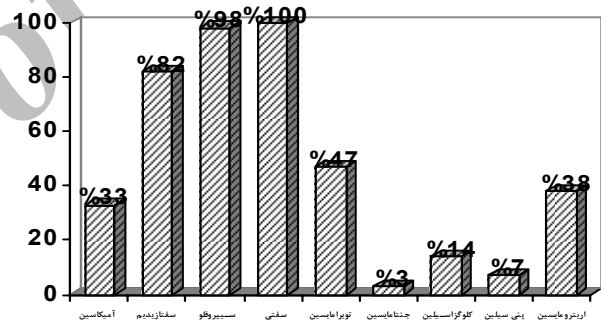


شکل ۵. تأثیر اسانس پرتقال بر روی کوکسیهای گرم مثبت جدا شده از ضایعات پوستی بیماران.

درصد حساسیت نسبت به آنتی بیوتیکها را بدین صورت نشان داد که: آمیکاسین ۳۳ درصد، سفنازیدیم ۸۲ درصد، سیپروفلوکساسین ۹۸ درصد، سفتری زوکسیم ۱۰۰ درصد، تویرامایسین ۴۷ درصد، جنتامایسین ۳ درصد، کلوزاسیلین ۱۴ درصد، پنی سیلین ۷ درصد و اریترومایسین ۳۸ درصد (شکل ۴).



شکل ۳. درصد نتایج حاصل از بررسی نوع باکتری های هوازی - بی هوازی اختیاری جدا شده از ضایعات پوستی بیماران.



شکل ۴. درصد نتایج حاصل از بررسی آنتی بیوگرام بر روی باکتری های هوازی - بی هوازی اختیاری جدا شده از ضایعات پوستی.

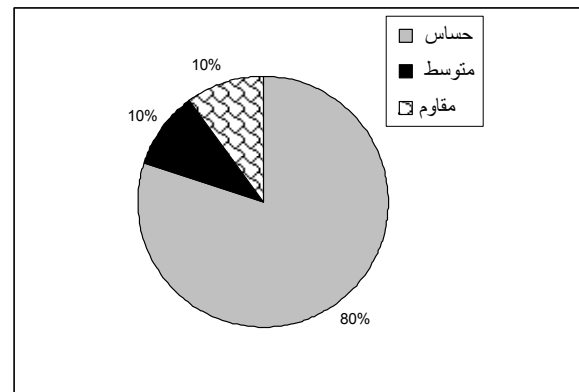
بررسی تأثیر اسانس پرتقال بر روی باکتریهای جدا شده از ضایعات پوستی در مقایسه با سایر آنتی بیوتیکها بر روی *استافیلوکوک* بدست آمد که بهترین جواب و مشابه سفتری زوکسیم بود. در حقیقت *استافیلوکوک* بخصوص *استافیلوکوک اپیدرمیدیس* حساس به اسانس پرتقال می باشد. از باسیلهای گرم منفی متعلق به خانواده *انتروباکتریاسه* ۱۰ درصد به اسانس پرتقال حساسیت کامل نشان دادند.

داد که اجزاء مورد آزمایش واجد فعالیت ضد میکروبی قابل توجهی است و می‌تواند موجب کاهش جمعیت میکروبی شود. زمان مورد نیاز جهت رسیدن به این حد در جمعیت سالمونلا بین ۰/۳ تا ۲۴/۸ ساعت متغیر بوده است.

در مطالعه ای که در سال ۲۰۰۳ در مکزیک انجام یافت، دریافتند که با افزایش غلظت فلاون در اسانس، به قدرت آنتی میکروارگانیزی آن افزوده می‌شود و قادر به جلوگیری از رشد قارچها نیز می‌باشد (۵) در مطالعه ای که در آمریکا بر روی اسانس پرتقال و اثر آنتی باکتریال آن انجام یافت دریافتند که اسانس پرتقال بر روی باکتریها و بخصوص سالمونلا می‌تواند خاصیت ضد میکروبی قابل توجهی داشته باشد (۷).

در تحقیق حاضر مقایسه با باکتریهای مانند سالمونلا که یکی از عوامل بیماریزای روده ای است انجام نشد، اما ادامه تحقیق با بررسی اثر عصاره خالص بر باکتریهای پاتوژن دستگاه گوارش در آینده امکان پذیر است.

تشکر: این پروژه با حمایت معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید بهشتی انجام شد.



شکل ۶. تأثیر اسانس پرتقال بر روی باسیلهای گرم منفی متعلق به خانواده آنتروباکتریاسه جدا شده از ضایعات پوستی.

این کوکسیها همچین می‌توانند شروع کننده ضایعات پوستی نیز باشند زیرا بیشترین مکان زندگی آنها بر روی پوست و مخاط انسان و سایر پستانداران است و منبع تغذیه آنها از غدد چربی پوست انسان توسط آنزیمها بخصوص لیپاز کوکسیها می‌باشد.

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که می‌توان از اسانس پرتقال بعنوان یک ماده ضد عفونی کننده در سطح ضایعات پوستی استفاده نمود. استخراج عصاره پرتقال معمولاً مشتمل بر استفاده از بخش معطر موجود در پرتقال است. اثر این بخش معطر بر روی سالمونلا توسط Parish et al. (2003) مورد بررسی قرار گرفت (۷). نتایج حاصل نشان

منابع

۳- میر حیدر، حسین، ۱۳۷۵، معارف گیاهی- کاربرد گیاهان در پیشگیری و درمان بیماریها (جلد دوم)، چاپ دوم، صفحه ۱۳۲-۱۳۳ چاپخانه دفتر نشر فرهنگ اسلامی.

۴- میر حیدر، حسین، ۱۳۶۴، دایرة المعارف گیاهی - گنجینه اسرار گیاهان، چاپ اول، صفحه ۹۵-۹۶ انتشارات وحید.

5- Almada - Ruiz, E., Martinez - Tellez, M.A., Hernandez - Almos, M.M., Valle, S., PrimoYufera, E., Vargas - Arispuro, I., 2003. Fungicidal potential of methoxylated flavones from citrus for invitro control of colletotrichum gloeosporioides Pest. Manag. Sci. 59(11):1245-9.

۱- رجحان، محمد صادق ۱۳۷۹. بهداشت و درمان با گیاهان داروئی و فارماکوتگزوی، چاپ اول، صفحه ۸۷-۸۸ انتشارات طنین.

۲- مومنی، تاج خانم- نوبهار شاهرخی، ۱۳۷۷. اسانسهای گیاهی و اثرات درمانی آنها، چاپ دوم، صفحه ۱۱۲-۱۱۴ انتشارات دانشگاه تهران.

6- Baier, W. E., 1923. The extraction of orange oil by volatile solvents. Thesis for PhD, California Institute of Technology. USA, (Electronic Thesis). <http://etd.caltech.edu/etd/available/etd-02082005-155830>

7- Parish, M E., Baum, D., Kryger, R., Goodrich, R. M., Baum, R., 2003. Fate of salmonellae in citrus

- oils and aqueous aroma. J. Food. Prot. 66(9): 1704-1707
- 8- Ramadan, W., Mourad, B., Ibrahim, S., Sonbol, F., 1996. Oil of bitter orange: new topical antifungal agent, Int. J. Dermatol. Jun. 35(6):448-9
- 9- Wattenberg, L.W., Coccia, J.B., 1991. Inhibition of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl) – 1 – butanone carcinogenesis in mice by D-limonene and citrus fruit oils. Carcinogenesis. 12(1):115-7

Investigation on the Effects of Purified Orange Oil on Facultative Aerobic and Anaerobic Found in Skin Lesions of the Patients

Minoui S.¹, Eslami G.², Minai-tehrani D.³, and Teymouri E.²

¹ Research Institute of Environmental Sciences, Shahid Beheshti University, Tehran

² Microbiology section, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran

³ BioResearch Lab, Faculty of Biological Sciences, Shahid Beheshti University, Tehran

Abstract

Increasing of antibiotic resistance bacteria and lack of a proper outline of treatment of infections caused this research. This descriptive study was carried out on 100 patient's skin lesions. Collecting of specimens was in a sterile condition and in Triptikase soy broth media with a swab or a sterile syringe. The samples were cultured on blood agar-MC conkey – nutrient agar – chocolate agar and bile esculine agar and then incubated in 37°C, and then the colonies were cultured for 24 to 48 hours. Further to gram staining and sepecifying the gram positive or gram negative bacteria, some complementary tests also were carried out on doubtful colonies after specification of the bacteria. The sensitivity of 70% from cases of gram positive cocci to purified orange oil was to the following antibiotics such as Erythromycin, Penicillin, Cloxacillin, Gentamycin, Tubramycin, Ceftizoxime, Ciprofloxacin, Ceftazidime and Amikacin. 10% from gram positive cocci were semi sensitive and the remainders (20%) were resistant. 10% from gram negative bacilli of Enterobacteriaceae were sensitive, 10% were semisensitive and 80% were resistant to purified orange oil. The most important outcome of this research shows that the orange oil can be used as an antiseptic on skin lesions. There may be some probable side effects of orange oil, which may require some complementary investigation in future if offered to distinguish more about side effects of the orange oil in therapeutic aids.

Keywords: Orange oil extract, Skin disease, infection, Vitamine C