Archive of SID

مجلـه دانشگـاه علـوم پـــزشکـی اردبیـل

دوره یازدهم، شماره سوم، پاییز ۱۳۹۰، صفحات ۲۱۸ الی ۲۲۷

اثرات ضد باکتریایی عصاره‌های *اوکالیپتوس* گلوبولوس بر روی *بروسلا ملی تنسیس M16* و *بروسلا آبورتوس S99* در شرایط آزمایشگاهی و مدل حیوانی

پیمان عبداله زاده[۱]، دکتر رضا شاپوری[۲]، دکتر شهرزاد نصیری سمنانی[۳]

[۱] کارشناس ارشد میکروب شناسی، مرکز تحقیقات بیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد زنجان، زنجان، ایران

[۲] نویسنده مسئول: استادیار میکروب شناسی، مرکز تحقیقات بیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد زنجان، زنجان، ایران

E-mail: rezashapoury@yahoo.com

[۳] استادیار میکروب شناسی، مرکز تحقیقات بیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد زنجان، زنجان، ایران

چکیده

زمینه و هدف: بروسلوزیس توسط پاتوژن‌های داخل سلولی از جنس بروسلا ایجاد می‌شود که مخزن طبیعی آن حیوانات خانگی و وحشی می‌باشند. بررسی‌ها نشان می‌دهند که گیاهان دارویی می‌توانند با اطمینان و بطور موفقیت آمیز در درمان بیماری‌های باکتریایی بدون بروز اثرات مضر و مقاومت‌های دارویی به کار برده شوند.

روش کار: در این مطالعه عصاره‌های آبی، اتانولی و استونی برگ‌های اوکالیپتوس تهیه شدند. سپس میزان MIC و MBC عصاره‌ها برای بروسلا ملی تنسیس 16M و بروسلا آبورتوس S99 با روش‌های رقت در براث و انتشار چاهکی در آگار تعیین شد. در مطالعه مدل حیوانی، ابتدا 10^5 CFU/ml باکتری بروسلا به صورت داخل صفاقی تزریق شد و بعد از ۲٤ ساعت مقدار ۰/۵ سی‌سی (برابر با غلظت MBC عصاره‌ها) از عصاره‌های اوکالیپتوس به صورت داخل صفاقی به موش‌های ماده BALB/c تزریق شد. سپس طبق پروتکل‌های استاندارد تعداد کلونی‌های بروسلای طحالی پس از ۷ روز با کشت بر روی محیط مولر-هینتون آگار شمارش شد.

یافته ها: نتایج نشان دادند که MIC و MBC عصاره آبی اوکالیپتوس برای بروسلا ملی تنسیس M16 و بروسلا آبورتوس S99 به ترتیب، ۱:۸۰ (۱۰/۸۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و ۱:٤۰ (۲۱/۶۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و برای عصاره استونی ۱:۱۲۸۰ (۰/٦٤ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و ۱:٦٤۰ (۱/۲۹ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و عصاره اتانولی ۱:۲۵٦۰ (۰/۳۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و ۱:۱۲۸۰ (۰/۶۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) بودند. در شرایط in vivo، میانگین تعداد بروسلا ملی تنسیس 16M رشد کرده در ٤۸ ساعت پس از کشت سوپرناتانت طحالی برای عصاره‌های آبی، اتانولی و استونی به ترتیب 10^3 ۵ CFU/ml ، 10^2 ۲ FU/ml، 10^2 ۶ CFU/ml در مقایسه با گروه کنترل 10^{10} ٤ CFU/ml بودند. هم چنین نتایج آزمایشات in vivo برای بروسلا ابورتوس S99 برای عصاره‌های آبی، اتانولی و استونی به ترتیب 10^3 ۳ CFU/ml ، 10^2 ۱ CFU/ml، 10^2 ۳ CFU/ml در مقایسه با گروه کنترل 10^9 ۹ CFU/ml بودند و این نتایج کاهش معنی‌دار ($p<0/01$) بروسلا را در تمام گروه‌های آزمون نشان دادند.

نتیجه گیری: نتایج بررسی‌های شرایط آزمایشگاهی و مدل حیوانی نشان داد که عصاره‌های استونی و اتانولی اوکالیپتوس در مقایسه با عصاره آبی بیشترین فعالیت ضد میکروبی مؤثر بر روی بروسلا ملی تنسیس 16M و بروسلا آبورتوس S99 دارند و می‌توانند در درمان بروسلوز انسانی و حیوانی مفید باشند.

کلمات کلیدی: بروسلا ملی تنسیس 16M؛ بروسلا آبورتوس S99؛ عصاره های اوکالیپتوس؛ اثرات ضد میکروبی

دریافت: ۹۰/۱/۲۰ **پذیرش:** ۹۰/۶/۲۰

*مقاله حاضر حاصل از نتایج پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد رشته میکروبشناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان می باشد.

لطفا به این مقاله به شکل زیر ارجاع دهید:

Abdolahzade P, Shapouri R, Nasiri Semnani SH . Antibacterial Effects of *Eucalyptus globulus* Extracts on *Brucella melitensis M16 and Brucella abortus S99* In Vitro and In Vivo. J Ardabil Univ Med Sci. 2011; 11(3): 218-227. (Full text in Persian)

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

امروزه به علت بروز مقاومت‌های دارویی و توانایی باکتری‌ها در ایجاد عفونت‌های حاد، استفاده از گیاهان به منظور بررسی اثرات ضدمیکروبی آنها، مطرح شده است. مطالعات متعددی اثبات کرده‌اند که بسیاری از گیاهان توانایی بالایی علیه پاتوژن‌های باکتریایی و قارچی انسانی دارند. در بسیاری از کشورهای در حال توسعه روش‌های درمان سنتی متکی بر گیاهان هنوز اعتبار دارد. طبق برآورد سازمان جهانی بهداشت بیش از ۸۰٪ مردم دنیا از داروهای گیاهی استفاده می‌کنند و حدود یک چهارم از داروها حاوی ماده موثره مشتق از گیاهان هستند و حدود ۱٤۰۰ محصول گیاهی در اروپا و ایالات متحده تولید می‌شوند [۱].

اوکالیپتوس[1] از گیاهان خانواده مورد[2] بوده و یکی از معروف‌ترین گیاهان دارویی است که از دیر باز اثرات ضدمیکروبی آن مورد توجه بوده است. این گیاه منبع غنی از پلی‌فنل‌ها و ترپنوئیدهاست و ترکیب اصلی برگ آن اکالیپتول[3] یا سینئول[4] (۷۰ تا ۸۰ درصد) می‌باشد. اعضای این خانواده منبع مهمی از روغن‌های ضروری با فعالیت‌های بیولوژیکی وسیع از جمله خواص آنتی اکسیدانی، ضدباکتریایی و ضدقارچی می‌باشند. گیاهان موجود در این خانواده به طور وسیعی در داروسازی، صنایع غذایی و لوازم آرایشی کاربرد دارند. روغن‌های ضروری برگ‌های گیاه اوکالیپتوس به طور وسیعی در سراسر جهان به عنوان ضدعفونی کننده و کاهش‌دهنده علایم سرفه، گلودرد، آنفلوانزا، گرفتگی سینوس‌ها، تب، نفخ، احتقان و سایر عفونت‌ها به کار می‌روند [۶-۲].

بروسلاها باکتری‌های غیر متحرک، بدون اسپور، گرم منفی به شکل کوکوباسیل یا میله‌ای کوتاه می‌باشند. بر روی محیط‌های معمول باکتری‌شناسی به کندی رشد می‌کنند و رشدشان به وسیله سرم و خون تسهیل می‌گردد. دارای متابولیسم هوازی بوده و تحت شرایط بی‌هوازی کامل رشد نمی‌کنند. معمولاً در حضور دی اکسید کربن رشد آنها افزایش می‌یابد به طوری که وجود دی اکسید کربن برای رشد برخی از سویه‌ها ضروری است. این باکتری‌ها انگل اجباری حیوانات و انسان هستند که اختصاصاً جایگاه آنها در درون سلول‌ها می‌باشد. بیشترین عوامل بروسلوز انسانی، بروسلا ملی تنسیس و بروسلا آبورتوس می‌باشند. در بروسلوز انسانی، بیماری به صورت یک مرحله حاد باکتریمی تظاهر می‌کند که ممکن است در مدت چندین سال در شکل یک مرحله مزمن ادامه یافته و بافت‌های متعددی را گرفتار کند.

تتراسایکلین‌ها و ترجیحاً داکسی سایکلین به طور کلی در مقابل اکثر سویه‌های بروسلا فعال هستند اما با این حال از آنجایی که این آنتی بیوتیک یک داروی باکتریواستاتیک است عود بیماری پس از یک پاسخ موفقیت آمیز اولیه، شایع می‌باشد. ثابت شده است که ترکیب داکسی سایکلین همراه با ریفامپین یا جنتامایسین در این مورد موثر بوده و باعث کاهش موارد عود بیماری می‌شود. در مدت چند روز پس از شروع درمان، علایم بیماری ممکن است تخفیف یابد اما در هر حال به لحاظ موقعیت داخل سلولی، ارگانیسم‌ها به سهولت ریشه‌کن نمی‌شوند. برای دستیابی به نتایج بهتر، درمان باید طولانی‌تر باشد. از آنجایی که تتراسایکلین‌ها برای کودکان و جنین‌ها سمی هستند، در زنان باردار و نوزادان باید تری متوپریم-سولفا متوکسازول را جایگزین داکسی سایکلین نمود [۸-۷].

بنابراین استفاده از درمان‌های جایگزین برای کنترل عفونت‌های ناشی از این باکتری ضروری به نظر می‌رسد. هدف از این بررسی، یافتن مواد جدید با فعالیت ضدمیکروبی علیه بروسلا بدون داشتن آثار سوء می‌باشد.

[1] Eucalyptus globulus
[2] Myrtaceae
[3] Eukalyptul
[4] Cineole

www.SID.ir

Archive of SID

روش کار

برگ‌های تازه گیاه اوکالیپتوس گلوبولوس در دی ماه ۱۳۸۹ از حوالی شهرستان اهواز جمع آوری و پس از شناسایی توسط گیاه شناسان مورد استفاده قرار گرفتند.

بروسلا ملی تنسیس M16 و بروسلا آبورتوس S99 از دانشگاه تربیت مدرس تهیه شدند. باکتری‌ها پس از کشت بر روی محیط‌های بروسلا براث و بروسلا آگار و انجام برخی تستهای تاییدی نظیر بررسی مرفولوژی باکتری و رنگ‌آمیزی، تست کاتالاز و اکسیداز، اوره آز و مجاورت با سرم رایت مثبت در محیط بروسلا براث حاوی ۲۰٪ گلیسرول در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد برای کارهای بعدی نگه داری شدند. موش‌های ماده BALB/c مورد استفاده در این پژوهش از انستیتو پاستور کرج تهیه شدند.

محیط‌های کشت مصرف شده شامل بروسلا آگار، بروسلا براث، مولر هینتون آگار و مولر هینتون براث بودند که همگی از شرکت BIO-RAD خریداری شدند. سایر مواد مورد استفاده از شرکت مرک آلمان تهیه شد.

تهیه عصاره‌های آبی، اتانولی و استونی برگ‌های اوکالیپتوس

برگ‌های گیاه اوکالیپتوس پس از خشک شدن در سایه، توسط آسیاب برقی پودر شدند. مقدار ۱۰۰ گرم از پودر گیاهی را به نسبت ۱:۵ با حلال‌های مورد آزمایش یعنی آب مقطر، اتانول ۹۵٪ و استون مطلق مخلوط کردیم. مخلوط‌های حاصل به مدت ۲٤ ساعت در دمای آزمایشگاه نگهداری و هر یک ساعت یک بار با یک میله شیشه‌ای هم‌زده شدند. مخلوط‌های مذکور توسط گاز استریل ٤ لایه‌ای و قیف صاف گردیدند. برای جدا کردن ناخالصی‌های موجود در عصاره‌های مورد نظر، با دور ۲۵۰۰ در دقیقه و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتیگراد سانتریفوژ شد. سپس عصاره‌های صاف شده به دستگاه تقطیر در خلاء برای خارج کردن حلال‌های مورد نظر منتقل شدند که در نهایت عصاره‌های غلیظی به دست آمدند. عصاره‌های حاصل با استفاده از فیلترهای میکروبی ۰/٤۵ میکرونی استریل و در میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری استریل تقسیم و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند [۱۱-۹].

تعیین [1] MIC و [2] MBC عصاره‌ها

برای تعیین MIC و MBC عصاره‌ها از روش ماکرودایلوشن[3] استفاده شد. برای این منظور MIC و MBC عصاره‌های آبی، اتانولی و استونی اوکالیپتوس بر روی باکتری‌های مورد آزمایش، ابتدا رقت‌های ۱:۵، ۱:۱۰، ۱:۲۰ تا ۱:۲۵۶۰ از عصاره‌ها در محیط مولر هینتون براث تهیه گردیدند. سپس با افزودن ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون میکروبی معادل با کدورت ۰/۵ مک فارلند غلظت‌های نهایی عصاره‌ها به میزان ۱:۱۰ تا ۱:۵۱۲۰ تنظیم شدند. لوله‌ها در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در حضور ۱۰-۷ درصد CO_2 به مدت ۵ شبانه‌روز انکوبه گردیدند. در هر روز کدورت لوله‌ها بررسی شده و یک ساب کالچر بر روی محیط مولر هینتون آگار نیز داده شد. این بررسی سه بار تکرار شده و در کنار لوله‌های تست برای تعیین MIC، کنترل مثبت شامل باکتری در محیط فاقد عصاره برای مقایسه کدورت لوله‌های تست انجام گرفت. اولین لوله از غلظت‌های پایین عصاره‌ها که فاقد کدروت ناشی از رشد باکتری بودند به عنوان غلظت MIC و اولین لوله از غلظت‌های پایین عصاره‌ها که در آنها ۹۹/۹٪ از مقدار اولیه باکتری‌های اضافه شده از بین رفته و در ساب کالچر فقط ۰/۱٪ از باکتری‌ها رشد کرده بودند به عنوان غلظت MBC برای هر عصاره محاسبه گردید [۱۲-۱۰].

[1] Minimum Inhibitory Concentration
[2] Minimum Bactericidal Concentration
[3] Micro dilution

www.SID.ir

Archive of SID

تعیین اثر عصاره ها به روش انتشار چاهکی در آگار: در روش انتشار چاهکی در آگار، بر روی محیط چاهک‌هایی به قطر ۵ میلی‌متر ایجاد شد. پس از کشت باکتری از سوسپانسیون ۰/۵ مک‌فارلند توسط سواپ استریل، در هر چاهک حدود ۹۰ میکرولیتر از رقت‌های مختلف عصاره تلقیح شد. سپس پلیت‌ها در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در حضور ۱۰-۷٪ CO_2 به مدت ۵ شبانه روز انکوبه و در نهایت هاله های عدم رشد باکتری‌ها اندازه گیری شد [۱۲-۱۰].

بررسی اثر ضد میکروبی عصاره‌ها در مدل حیوانی:

جهت بررسی اثر ضدمیکروبی عصاره‌های اوکالیپتوس در مدل حیوانی، از موش‌های ماده Balb/c ۸-۶ هفته‌ای استفاده شد. ٤٠ سر موش ماده Balb/c به ۸ گروه ۵ تایی تقسیم شدند. از هر عصاره به ۲ گروه تزریق و ۲ گروه نیز به عنوان گروه‌های شاهد دریافت‌کننده نرمال سالین استریل بودند [۱۳].

برای تهیه سوسپانسیون میکروبی جهت ایجاد عفونت در موش‌ها، از کشت ٤٨ ساعته بروسلا، سوسپانسیون ۰/۵ مک‌فارلند که حاوی $۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ باکتری در هر میلی‌لیتر بود تهیه کرده و آن را به نسبت ۱:۳۰۰ در نرمال سالین استریل رقیق کردیم تا رقت سوسپانسیون میکروبی جهت تزریق، به تعداد ۵×۱۰^{۵} باکتری در هر میلی‌لیتر برسد [۱۳].

در روز اول به هر گروه، تعداد ۵×۱۰^{۵} باکتری بروسلا به صورت داخل صفاقی تزریق شد. در روز بعد، ۰/۵ سی سی (برابر غلظت MBC عصاره‌ها) از عصاره‌های آبی، اتانولی و استونی اوکالیپتوس به صورت داخل صفاقی به ۶ گروه و نرمال سالین به ۲ گروه شاهد تزریق شد. پس از ۷ روز، موش‌ها با بیهوشی کشته شدند و طحال حیوانات در شرایط استریل خارج گردید و در فسفات بافر سالین استریل به مقدار ۵ میلی‌لیتر هموژنیزه شد سپس از سوسپانسیون هموژنیزه طحالی بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت انجام گرفت. پلیت‌های مذکور در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به همراه ۷٪ دی اکسیدکربن گرمخانه گذاری شد [۱۳].

آنالیز آماری

داده‌ها با نرم‌افزار SPSS ویراست ۱۳ و آزمون آماری آنوای یکطرفه تحلیل شدند. در این مطالعه p کمتر از ۰/۰۱ معنی دار تلقی شد.

یافته ها

نتایج تعیین MIC و MBC عصاره‌ها به روش ماکرودایلوشن

این نتایج نشان می‌دهند که MIC و MBC عصاره آبی اوکالیپتوس در رقت ۱:۸۰ (۱۰/۸۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و ۱:٤٠ (۲۱/۶۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، عصاره اتانولی در رقت ۱:۲۵۶۰ (۰/۳۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و ۱:۱۲۸۰ (۰/۶۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و عصاره استونی در رقت ۱:۱۲۸۰ (۰/٦٤ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و ۱:۶٤۰ (۱/۲۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر) می‌باشد. این نتایج نشان می‌دهند که عصاره اتانولی اوکالیپتوس نسبت به عصاره استونی آن، فعالیت ضدمیکروبی بیشتری علیه باکتری مذکور دارد. اما فعالیت عصاره آبی نسبت به دو عصاره اتانولی و استونی کمتر است.

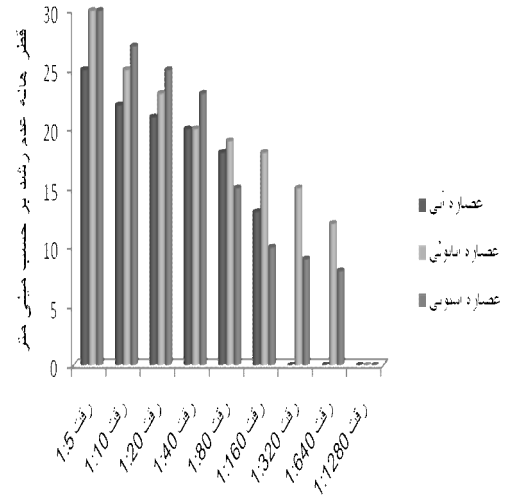
نتایج بررسی اثر عصاره‌ها به روش انتشار چاهکی

در نمودارهای ۱و۲ قطر هاله‌های عدم رشد برای دو سویه M16 و S99 آورده شده است. با توجه به نمودار ۱ که مربوط به سویه 16M است مشخص می‌شود که بیشترین هاله عدم رشد مربوط به عصاره‌های استونی و اتانولی اوکالیپتوس بوده و مقدار آن در رقت ۱:۵ به ترتیب برابر ۱۶۶ و ۱۶۲/٤ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر است. همچنین از این نمودار مشخص می‌شود که کمترین هاله عدم رشد

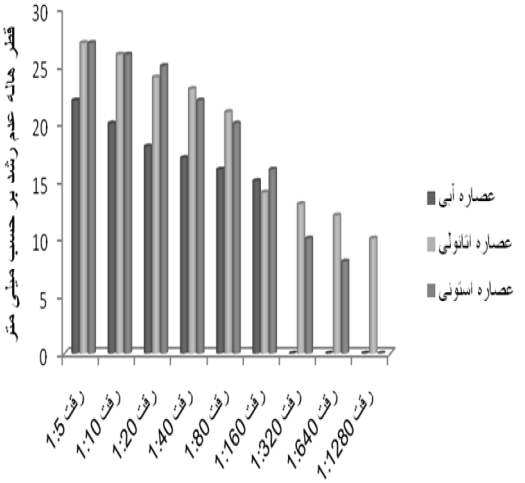
www.SID.ir

Archive of SID

مربوط به عصاره استونی اوکالیپتوس و در رقت ۱:۶۴۰ (۱/۲۹ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) می‌باشد.



نمودار ۱. قطر هاله عدم رشد سویه 16M



نمودار ۲. قطر هاله عدم رشد سویه S99

همچنین مقدار حداکثر و حداقل هاله عدم رشد برای عصاره آبی به ترتیب برابر ۲۵ و ۱۳ میلی‌متر، عصاره اتانولی ۳۰ و ۱۲ میلی‌متر و عصاره استونی ۳۰ و ۸ میلی‌متر می‌باشد. با توجه به نمودار ۲ که مربوط به سویه S99 است مشخص می‌شود که بیشترین و کمترین هاله‌های عدم رشد مشابه سویه 16M می‌باشند. همچنین مقدار حداکثر و حداقل هاله عدم رشد برای عصاره آبی به ترتیب برابر ۲۲ و ۱۵ میلی‌متر، عصاره اتانولی ۲۷ و ۱۰ میلی‌متر و عصاره استونی ۲۷ و ۸ میلی‌متر می‌باشد. با توجه به نتایج به دست آمده مشخص می‌شود که در رقت‌های مشخص، حساسیت سویه M16 نسبت به انواع عصاره‌های اوکالیپتوس در مقایسه با سویه S99 بیشتر می‌باشد.

نتایج بررسی اثر عصاره ها در مدل حیوانی

این نتایج در جداول ۱و۲ نشان داده شده است. با توجه به این جداول مشخص می‌شود که عصاره اتانولی اوکالیپتوس، موثرترین عصاره در مدل حیوانی علیه هر دو سویه مورد مطالعه می‌باشد. آنالیز آماری نشان می‌دهند که اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های آزمون و گروه کنترل وجود دارد.

جدول۱. نتایج بررسی اثر عصاره های اوکالیپتوس بر روی سویه *16M* در مدل حیوانی

نوع عصاره	میانگین ± انحراف معیار باکتری های رشد کرده از بافت طحال موشهای آلوده بر حسب CFU/ml
آبی	۵۰۰۰±۱۰۰*
اتانولی	۲۰۰±۱۰*
استونی	۶۰۰±۱۰*
کنترل (نرمال سالین)	$۱۰^{۱۰}$ (٤±۱)

*** نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه کنترل با *p<0.01* در آزمون آنوای یکطرفه**

جدول ۲. نتایج بررسی اثر عصاره های اوکالیپتوس بر روی سویه *S99* در مدل حیوانی

نوع عصاره	میانگین ± انحراف معیار باکتری های رشد کرده از بافت طحال موشهای آلوده بر حسب CFU/ml
آبی	۳۰۰۰±۱۰۰ *
اتانولی	۱۰۰±۱۰ *
استونی	۳۰۰±۱۰ *
کنترل (نرمال سالین)	$۱۰^{۹}$ (۹±۱)

*** نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه کنترل با *p<0.01* در آزمون آنوای یکطرفه**

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

بروسلوزیس یکی از مهمترین بیماری‌های مشترک بین انسان و حیوان است که از طریق خوردن محصولات حیوانات آلوده به انسان منتقل می‌شود. نمای بالینی آن غیراختصاصی بوده و تظاهرات بسیار متغیری را نشان می‌دهد و می‌تواند از یک بیماری حاد تب دار تا یک بیماری خفیف و نامشخص بروز نماید. مدت بیماری نیز می‌تواند از چند روز تا چندین سال به درازا کشیده و در حیوانات مبتلا موجب کاهش تولید شیر، گوشت و پشم شود. این بیماری مشکل بهداشتی مهمی است که در سراسر جهان اتفاق می‌افتد اما میزان بروز بروسلوز انسانی در سطح جهان مشخص نیست و این ناشی از تفاوت در کیفیت سیستم گزارش‌دهی و اطلاع‌رسانی در کشورهای مختلف است. سالانه بیش از نیم میلیون مورد جدید بروسلوز از ۱۰۰ کشور جهان به WHO گزارش می‌شود که قسمت اعظم آن خاص کشورهای جهان سوم است [۱٤].

در ایران نیز بروسلوز انسانی در تمام نقاط کشور آندمیک بوده و طبق آخرین گزارش‌ها شیوع بروسلوز انسانی در ایران ۱۳۲/٤ نفر در هر ۱۰۰۰۰۰ نفر می‌باشد و گزارشات نشان می‌دهند که کودکان یکی از مهمترین گروه سنی بیماران هستند [۱۵].

در این مطالعه اثرات ۳ نوع عصاره گیاه دارویی اوکالیپتوس بر روی دو سویه بیماریزای بروسلا که منجربه بیماری تب مالت در انسان می‌شوند، بررسی شد. با توجه به نتایج به دست آمده، MIC وMBC انواع عصاره‌های آبی، اتانولی و استونی اوکالیپتوس برای هر دو سویه M16 و S99 یکسان می‌باشند. اما در هاله عدم رشد در پلیت دو سویه نتیجه یکسانی نشان نداده و سویه M16 نسبت به سویه S99 حساسیت بیشتری نسبت به رقت‌های مختلف عصاره‌ها از خود نشان داد. در این مطالعه مشخص شد که عصاره‌های استونی و اتانولی اوکالیپتوس نسبت به عصاره آبی آن فعالیت ضدمیکروبی بیشتری بر روی بروسلا ملی تنسیس M16 و بروسلا آبورتوس S99 دارند که شاید به علت تفاوت بین دو سویه و نفوذپذیری عصاره‌ها به درون ارگانیسم باشد.

با توجه به غلظت‌های MIC و MBC عصاره‌ها مشخص می‌شود که حتی در غلظت‌های پایین نیز عصاره‌های به دست آمده از اوکالیپتوس دارای فعالیت ضدمیکروبی خوبی علیه بروسلا می‌باشند. نتایج مدل حیوانی نیز نشان دادند که از میان عصاره‌های مورد آزمایش، عصاره اتانولی اوکالیپتوس موثرترین عصاره علیه هر دو سویه مورد مطالعه می باشد.

در این مطالعه بر خلاف آزمایشات قبلی که بیشتر بر روی عصاره‌های آبی و الکلی اوکالیپتوس متمرکز بودند، عصاره استونی نیز تهیه و تحت بررسی آزمایشگاهی و مدل حیوانی قرار گرفت و مشخص شد که این عصاره دارای فعالیت ضدمیکروبی بیشتری علیه بروسلا نسبت به عصاره آبی این گیاه است. نتایج به دست آمده از این مطالعه با نتایج تحقیق اسرینیواسان[1] و همکاران انجام گرفت، مطابقت دارد. این محققین نشان دادند که اوکالیپتوس دارای اثر باکتری کشی بر روی طیف وسیعی از باکتری‌های گرم منفی (اشریشیا کلی، انتروباکتر فکالیس، کلبسیلا پنومونیه، پروتئوس میرابیلیس، سودوموناس آئروژینوزا، سالمونلا پاراتیفی و سالمونلا تیفی) و گرم مثبت (باسیلوس سوبتیلیس و استافیلوکوکوس اورئوس) می‌باشد [۱۶].

همچنین نتایج به دست آمده از این مطالعه با نتایج تحقیقات قبلی محقق مطابقت دارد. آنها نشان دادند که عصاره کلروفرمی سیر (آلیسین) بر روی بروسلا ملی تنسیس Rev1 و بروسلا آبورتوس S19 دارای اثرات ضد میکروبی می‌باشد. نتایج تحقیق آنها نشان

[1] Srinivasan

www.SID.ir

Archive of SID

داد که میزان MIC و MBC این عصاره برای هر دو سویه مذکور یکسان است اما در هاله عدم رشد، دو سویه نتیجه یکسانی نشان نمی دهند. آنها هم چنین نشان دادند که عصاره سیر می‌تواند بر بروسلای درون ماکروفاژی اثر کرده و آن را از بین ببرد [۱۷-۱۹].

همچنین اثر مهاری عصاره‌های آبی و الکلی اوکالیپتوس در شرایط In Vitro بر روی سودوموناس آئروژینوزا توسط ستاری و همکاران نشان داده شد. مطالعات آنها نشان داد که عصاره‌های خام الکلی و آبی اوکالیپتوس به خوبی می‌توانند از رشد سودوموناس آئروژینوزا جلوگیری کنند و همچنین کاهش رشد سودوموناس آئروژینوزا در زیر غلظتهای بازدارنده دیده شد [۹].

همچنین محققین دیگر نشان دادند که اوکالیپتوس دارای خواص ضد قارچی خوبی علیه گونه‌های مختلف آسپرژیلوس می‌باشد. آنها در مطالعات خود اثر انواع عصاره‌های متانولی، اتانولی، کلروفرمی و بنزنی اوکالیپتوس را بر روی میکروب‌های مورد مطالعه بررسی کردند. نتایج بررسی‌های آنها نشان داد که عصاره متانولی این گیاه آثار ضدقارچی بیشتری نسبت به سایر عصاره‌ها دارد [۲۰].

جلالی و همکاران اثرات ضد لیستریایی گیاه اوکالیپتوس را بررسی کردند. نتایج حاصل از بررسی‌های آنها نشان داد که عصاره هیدروالکلی اوکالیپتوس در هر دو روش رقت لوله‌ای و انتشار دیسک دارای اثرات ضد باکتریایی بر روی لیستریا مونوسیتوژنز می‌باشد [۲۱].

همچنین در مطالعه‌ای دیگری در استرالیا نشان داده است که عصاره‌های این گیاه دارای اثر ضد قارچی بر روی کاندیدا آلبیکنس می‌باشند[۲۲] .

نتیجه گیری

با توجه به پیشینه این بیماری در خاورمیانه و به خصوص در ایران اعم از بروسلوز حیوانی و بروسلوز انسانی ضرورت دستیابی به یک رژیم دارویی بی‌خطر و موثرتر احساس می‌شود. در این مطالعه مشخص شد که عصاره‌های اوکالیپتوس می‌توانند به عنوان ترکیبات ضدبروسلایی مطرح باشند و با مطالعه اثرات ارگانولپتیک این عصاره‌ها در غذا می‌توان از آنها به عنوان یک محافظت کننده در برابر بروسلوز استفاده نمود و با انجام کارهای تکمیلی بر روی مطالعه حاضر می‌توان به داروی گیاهی موثر در برابر این باکتری‌های خطرناک با عوارض کمتر نسبت به داروهای شیمیایی موجود در بازار دست یافت.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان به دلیل ارائه امکانات و تجهیزات آزمایشگاهی جهت انجام این پژوهش در قالب پایان نامه کارشناسی ارشد سپاسگزاری می‌گردد.

References

1- Mitscher LA, Drake S, Golloapudi SR, Okwute SK. A modern look at folkloric use of anti infective agents. J Nat Prod. 1987 Nov-Dec; 50(6): 1025-1040.

2- Takasaki M, Konoshima T, Etoh H, Pal SI, Tokuda H and Nishino H. Cancer chemopreventive activity of euglobal-G1 from leaves of *Eucalyptus grandis*. Cancer Lett. 2000 Jul; 155(1): 61-65.

3- Siddiqui B, Sultana Im, Begum S. Triterpenoidal constituents from *Eucalyptus camaldulensis* var. *Obtusa* leaves. Phytochem. 2000; 54(8): 861-865.

4- Adebola O, Olusegun E, Olayide N, Bolanle A, Adeniyic, Wilfried AK. Antimicrobial activity

www.SID.ir

Archive of SID

of the essential oils of five *Eucalyptus* species growing in Nigeria. Fitoterapia. 1999 Oct; 70(5): 526-528.

5- Mulyaningsih S, Sporer F, Zimmermann S, Reichling J, Wink M. Synergistic properties of the terpenoids aromadendrene and 1,8-cineole from the essential oil of *Eucalyptus globulus* against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant pathogens. Phytomedicine. 2010 Nov; 17(13): 1061–1066.

6- Rocha Vilela G, Steffen de Almeida G, Aparecida Bismara Regitano D'Arce M, Heloisa Duarte Moraes M, Otavio Brito J, Fatima das G.F, et al. Activity of essential oil and its major compound, 1,8-cineole, from *Eucalyptus globulus* Labill., against the storage fungi *Aspergillus flavus* Link and *Aspergillus parasiticus* Speare. J Stored Prod Res. 2009; 45: 108–111.

7- Kilic S, Dizbay M, Hizel K, Arman D. In vitro synergistic activity of antibiotic combinations against *Brucella melitensis* using e-test methodology. Braz J. Microbiol. 2008 Jan; 39: 233-237.

8- Akova M, Gur D, Livermore D, Kosagoz T, Akalin H. In vitro activities of antibiotics alone and in combination against *Brucella melitensis* at neutral and acidic pHs. Antimicrob Agents Chemether. 1999 May; 5(43):1298–1300.

9- Sattari M, Shahbazi N, Najar Peeryeh S. An assessment of antibacterial effect of alcoholic and aquatic extracts of *Eucalyptus* leaves on *Pseudomonas aeruginosa*. J Med Sci. 2006 Spr-Sum; 8(5): 19-23. (Full text in Persian)

10- Igbal A, Beg AZ. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. J Ethnopharmacol. 2001 Feb; 74(2): 113-123.

11- Mohsen Nezhad F, Zeighami H, Mota A, Sattari M, Yadegar A. Antibacerial activity of *Eukalyptus* extracts on methicillin resistance *Staphylococcus aureus*. Res J Biol Sci. 2009; 4(8): 905-908.

12-Trujillano-Martín I, García-Sánchez E, Martínez IM, Fresnadillo MJ, García-Sánchez JE, García-Rodríguez JA. In vitro activities of five new antimicrobial agents againts *Brucella melitensis*. Int J Antimicrob Agents. 1999 Jul; 12(2): 185-186.

13- Naeini A, Khosravi A, Tadjbakhsh H, Ghazanfari T, Yaraee R, Shokri H. Evaluation of the immunostimulatory activity of *Ziziphora tenuior* extracts. Comp Clin Pathol. 2010 Apr; 19: 459-463.

14- Godfroid J, Kasbohrer A. Brucellosis in the European union and norway at the turn of the twenty–first century. Vet Microbiol. 2002 Dec; 90: 135-145.

15- Refai M. Incidence and control of brucellosis in the Near East region. Vet Microbiol. 2002 Dec; 90(1-4): 81-110.

16- Srinivasan D, Nathan S, Suresh T, Lakshmana Perumalsamy P. Antimicrobial activity of certain Indian medicinal plants used in folkloric medicine. J Ethnopharmacol. 2001 Mar; 74: 217–220.

17- Shapoury R, Sattari M, Zuhair MH. Studies on the antimicrobial effect of allicin on the intra macrophages *Brucella*. Pak J Biol Sci. 2006; 9(10): 1035-1939.

18- Shapoury R, Sattari M, Zuhair MH. Animicrobial effect of choloroformic extract of *Garlic* (allicin) on *Brucella melitensis Rev1* and *brucella abortus S19*. Sci-Res J Shahed Univ. 2004 Oct-Nov; 53: 21-24. (Full text in Persian)

19- Shapoury R, Sattari M, Zuhair MH. Study effect of *Garlic* choloroformic extract (allicin) on

www.SID.ir

Archive of SID

physiology and morphology of *Brucella*. J Med Plants Res. 2004 Jun; 3(10): 15-21. (Full text in Persian)

20- Satish S, Mohana DC, Raghavendra MP, Raveesha KA. Antifungal activity of some plant extracts against important seed borne pathogens of *Aspergillus sp*. J Agr Technol. 2007 Apr; 3(1): 109-119.

21- Jalali M, Abedi D, Ghasemi Dehkordi N, Chaharmahali A. Evaluation of antibacterial activity of ethanol extracts of some medicinal plants against *Listeria monocytogenesis*. J Shahrekord Univ Med Sci. 2006 Autumn; 8(3): 25-33. (Full text in Persian)

22- Wilkinson JM, Cavanagh HM. Antibacterial activity of essential oils from Australian native plants. Phytother Res. 2005 Jul; 19(7): 43-6.

www.SID.ir

Archive of SID

Antibacterial Effects of *Eucalyptus globulus* Extracts on *Brucella melitensis M16 and Brucella abortus S99* In Vitro and In Vivo

Abdolahzade P, MSc[1]; Shapouri R, PhD[2]; Nasiri Semnani SH, PhD[3]

[1] MSc of Microbiology, Biology Research Center, Islamic Azad University, Zanjan Branch, Zanjan, Iran.
[2] Corresponding Author: Assistant Prof. of Microbiology, Biology Research Center, Islamic Azad University, Zanjan Branch, Zanjan, Iran. E-mail: rezashapoury@yahoo.com
[3] Assistant Prof. of Microbiology, Biology Research Center, Islamic Azad University, Zanjan Branch, Zanjan, Iran.

ABSTRACT

Background & Objectives: Brucellosis is an infectious disease caused by intracellular pathogens of the genus Brucella that have their natural reservoir in domestic and wild animals. Many studies show that herbal medicines have been used safely and successfully to treat bacterial diseases without significant side effects and drug resistance problems.

Methods: In this study aquatic, alcoholic and acetonic extracts of *Eucalyptus globulus* leaves were prepared, then MIC and MBC of extracts for *B. melitensis 16M and B. abortus S99* were determined by broth macrodilution and agar well diffusion methods. In animal model study, 5×10^5 CFU/mL of Brucellae was injected intraperitoneally (i.p) to female BALB/c mice. After 24 hours, 0.5mL (equivalent MBC) of each *Eucalyptus globulus* extracts was injected (i.p) After 7 days, in spleen the colonies of brucellae were counted on Muller-Hinton agar as standard protocol.

Results: The MIC and MBC of *Eucalyptus globulus* for *B. melitensis* M16 and *B. abortus* S99 were 1:80 (10.81 mg/mL) and 1:40 (21.62 mg/mL) for aquatic extract, 1:1280 (0.64 mg/mL) and 1:640 (1.29 mg/mL) for acetonic extract, and 1:2560 (0.31 mg/mL) and 1:1280 (0.63 mg/mL), for ethanolic extract respectively. In culture of spleen supernatant (*in vivo*), after 48 hours, the average grown B. melitensis 16M colonies for aquatic, ethanolic and acetonic extracts were 5×10^3 CFU/ml, 2×10^2 CFU/ml and 6×10^2 CFU/ml, respectively in comparison with control group (4×10^{10} CFU/ml). These results for *B.abortus S99* were 3×10^3 CFU/ml, 1×10^2 CFU/ml and 3×10^2 CFU/ml, respectively in comparison with control group (9×10^9 CFU/ml) The results showed that bacterial load was significantly decreased in all experimental groups ($p<0.01$).

***Conclusion*:** The results of in vitro and in vivo indicate that ethanolic and acetonic extracts of *Eucalyptus globulus* have more effective antimicrobial activity on *B.melitensis M16 and B.abortus S99* than aquatic extract. It seems that the extracts *Eucalyptus globulus* can be used in treatment of human and animal brucellosis.

Key Words: *Brucella melitensis M16*; *Brucella abortus S99; Eucalyptus globulus* Extracts; Antimicrobial Effect

www.SID.ir