فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی ۵۱، جلد ۱۳، شماره ۴، پاییز۹۹، صفحه ۸۷تا ۹۸
Qjaphd.sinaweb.net ISSN: ۹۸۸۰-۱۷۳۵

# بررسی اثر ضد میکروبی عصاره های برگ گیاه به لیمو بر باکتری های استرپتوکوکوس پیوژن، استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس، کلبسیلاپنومونیه و بروسلا ملی تنسیس در شرایط آزمایشگاهی و مدل حیوانی

شهرزاد نصیری سمنانی[۱]، **نسترن قاسم پور**[۲]
۱- استادیارگروه میکروبیولوژی،دانشکده علوم پایه- مهندسی، واحد زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان،ایران.
۲-دانشجوی دکتری عمومی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه رازی کرمانشاه، ایران. **ng.nastaranghassempoor2060@gmail.com**

**تاریخ دریافت:۹۹/۵/۱ تاریخ پذیرش: ۹۹/۶/۳۰**

## چکیده

**زمینه و هدف: استرپتوکوکوس پیوژن، استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس، کلبسیلاپنومونیه و بروسلا ملی تنسیس مقاومت بالایی در درمان با آنتی بیوتیک ها دارند. هدف از این مطالعه، بررسی اثرات عصاره های برگ گیاه به لیمو بر روی باکتری های مذکور است.**

**روش کار: در این مطالعه پس از تهیه عصاره های برگ به لیمو، MIC و MBC و قطر هاله های عدم رشد با روش انتشار چاهکی در آگار و رقت در براث تعیین شد. در مطالعه مدل حیوانی، CFU/ml ۱۰^۵× ۵ باکتری ها (برابر با غلظت MBC عصاره ها) به صورت داخل صفاقی به موش های ماده BALB/c تزریق و تعداد کلونی های باکتری های طحالی طبق پروتکل استاندارد شمارش گردید.**

**یافته ها: MIC عصاره اتانولی برگ به لیمو در محدوده ی رقت های ۲۷/۸۱ تا ۱۱۱/۲۵میلی گرم بر میلی لیتر و MBC آن در محدوده ی ۵۵/۶۲ تا ۲۲۲/۵میلی گرم بر میلی لیتر بود. MIC عصاره استونی در محدوده ی ۴۸/۱۸ تا ۱۹۲/۷۵ میلی گرم بر میلی لیتر و MBC ۹۶/۳۷ تا ۱۹۲/۷۵ میلی گرم بر میلی لیتر مشخص گردید، برای عصاره آبی میزان MIC در محدوده ی ۱۰۳/۷۵ تا ۲۰۷/۵ میلی گرم بر میلی لیتر و MBC این عصاره در تمامی باکتری های مورد مطالعه رقت ۲۰۷/۵ میلی گرم بر میلی لیتر بود. در شرایط in vivo حساس ترین باکتری و مقاوم ترین باکتری کاهش معنی داری را میان گروه های تیمار شده با عصاره ها نسبت به گروه کنترل نشان داد. عصاره‌های اتانولی و استونی به لیمو در مدل حیوانی اثر ضد میکروبی بیشتری نسبت به عصاره آبی به لیمو داشت.**

**نتیجه گیری: عصاره های به لیمو اثر ضد میکروبی روی باکتری های مورد مطالعه دارند.**

**واژه های کلیدی:** اثر ضد میکروبی، عصاره های به لیمو، استرپتوکوکوس پیوژن، استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس، کلبسیلاپنومونیه ، بروسلا ملی تنسیس.

## مقدمه

با افزایش شیوع عفونت های باکتریایی و استفادهٔ گسترده ازآنتی بیوتیک ها و داروهای ضد میکروبی، شاهد شیوع گستردهٔ گونه های میکروبی مقاوم به آنتی بیوتییک، هم چنین بروز اختلالات و عوارض جانبی حاصل از آن مشاهده گردیده است(۳۴). بروسلوز یا تب مالت یک بیماری عفونی باکتریایی است که می توانند به طورمستقیم یا غیر مستقیم از دام آلوده به انسان منتقل شوند و به دلیل اهمیت بیماری در انسان و دام، اغلب کشورها درصدد ریشه کنی بیماری از جمعیت دامی میباشند. عفونت ایجاد شده در اثر بروسلا آبورتوس بیماری بنگ باعث سقط در گاو و به میزان کمتر در گوسفند و بز می شود(۱). بروسلا به دلیل این که در سیستم ماکروفاژهای غده های لنفاوی، غده پستان و اندام های تناسلی زنده می ماند و تکثیرمی-یابند، به طور معمول دارای درمان دشواری است و این امر به دلیل عدم توانایی نفوذ دارو از پرده های سلولی است(۵، ۱). درمان با داروهای شیمیایی و سنتزی علی رغم این که

تا حدودی می توانند نتیجه بخش باشند دارای عوارض بوده و نیز مقاومت داروئی ایجاد کنند.کلبسیلا پنومونیه، یک باکتری هوازی-اختیاری متعلق به خانواده انتروباکتریاسه بوده که طیف وسیعی از بیماری ها مانند عفونت های مجاری ادراری، سیستیت، پنومونی، عفونت های زخم های جراحی، اندوکاردیت عفونی و منتشره را در بیماران مستعد، به خصوص افراد آلوده به HIV و سرکوب کننده سیستم ایمنی ایجاد می کند(۱۳). استرپتوکوکوس پایوژنز با داشتن فاکتورهای ویرولانس از جمله اگزوتوکسین های B، A و C در ایجاد عفونت پوستی هم چون پسوریازیس دخالت دارد(۸) باتوجه به گسترش بیماری ها در سال های اخیر، دستیابی به روش های درمان و پیشگیری آن ها به طور چشمگیری افزایش یافته است. در پژوهش های مختلف بازگشت دوباره به فرآورده های طبیعی مانند محصولات دریایی و عصاره گیاهان دارویی در کنار به کارگیری از داروهای سنتتیک می تواند رویکرد موثری در درمان و کنترل پیشرفت طیف وسیعی از بیماری های باکتریایی و سرطان داشته باشد(۳۹، ۲۱). از دیرباز گیاهان به عنوان یکی از منابع درمان مورد نظر بوده و از نظر پزشکی حایز اهمیت می باشند. به تازگی پژوهشگران در حال یافتن ترکیبات دارویی با منشای گیاهی هستند که دارای اثرات جانبی نباشند(۴۰، ۱۲، ۱۰). گیاهان دارای ترکیبات ثانویه هستند که می توان به عنوان دارو جهت مطالعات مورد استفاده قرار داد(۲۵، ۱۵). گیاه به لیمو(*Aloysia citrodora*) یکی از گیاهان بومی کشور ایران بوده که امروزه در شمال کشورایران کشت می گردد. علاوه برآن، گونه های بومی ای آن نیز از جنس Lippia در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری کشورمان نیز وجود دارند(۱۲). در طب سنتی از این گیاه در درمان سوء هاضمه، نفخ، سردردهای یک طرفه، دردهای عصبی، سرگیجه و علائم سرماخوردگی، تقویت حافظه و ایجاد آرامش استفاده می شود(۳۲، ۲۰، ۱۵). هم چنین برخی از گونه های آن دارای خاصیت ضد مالاریایی و ضد ویروسی می باشند(۳۷، ۲۷، ۱۱). شاه حسینی و همکارانش بیان نمودند که بیشترین اثرات ضد باکتریایی عصاره ی گیاه به لیمو بر روی باکتری گرم منفی *P. aeruginosa* و کمترین اثر را بر روی باکتری گرم مثبت B. subtilis دارد که خود نشان دهنده وجود ترکیب یا ترکیبات ضد باکتری قوی در عصاره ی این گیاه می باشد(۳۳). Mothana و همکارانش خواص ضد باکتریایی و آنتی اکسیدانی گیاه به لیمو بومی کشور آلمان را مطالعه کردند و نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره این گیاه دارای ترکیبات متفاوت از گیاه مورد مطالعه بوده و بیشترین تاثیر را بر روی باکتری های گرم مثبت دارد و دارای فعالیت ۴۳%آنتی اکسیدانی است(۲۴). Pinto و همکارانش خاصیت ضدباکتریایی چندین گونه ازAloysia را مورد مطالعه قراردادند. نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره گیاه *A. origanoides* دارای بیشترین خاصیت ضدباکتریایی بر علیه باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس و مخمر بیماری زای کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا پاراپسیلوزیس دارد(۲۸). مطالعات بسیاری در رابطه با اثرات و خواص آنتی اکسیدان این گیاه صورت گرفته است(۳۰، ۲۹). در مطالعه ای بررسی میزان فعالیت آنزیم های کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز در سلول-های خونی اندازه گیری شده است. افزایش میزان این آنزیم ها در سلول هایی که در معرض آسیب سلولی قرار گرفته اند نشان داد که گیاه به لیمو دارای خواص آنتی اکسیدان می باشد(۳۰). نتایج شاه حسینی و همکارانش، بر روی ترکیبات تشکیل دهنده اسانس گیاه به لیمو نشان داد که اسانس این گیاه دارای ۲۰ -۱۶ترکیب است که بیشترین ترکیب مربوط به Geranial( ۳۶/۸ ٪)،Neral( ۲۸/۳ ٪) و Limonene(۷/۲۷٪) بود(۳۳). ترکیبات شیمیایی اسانس به شامل میرسنون، آلفا- توجون، لیمونن و لیپیفولنن(۶). محققین اسپانیولی نیز در سال ۱۹۷۶توانسته اند اثبات کنند

که گیاه به لیمو حاوی موسیلاژ، اسانس، تانن هیدرولیز شونده، فنل های اسیدی، فلاونوئید و آلکالوئید می باشند(۳). در سال ۱۳۸۵ عزت ا... قائمی و همکارانش در ایران اثر گیاه به لیمو را بر زخم های جلدی ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس در مدل حیوانی مورد مطالعه قرار دادند و مشاهده کردند که این عصاره قادر است بروز عفونت را در محل آلوده به تاخیر بیاندازد ولی قادر به جلوگیری از بروز عفونت زخم نمی باشد(۷). در مطالعه های دیگری کوآن در سال ۱۹۹۹و سارتوراتو در سال ۲۰۰۴ به همراه همکارانشان اثر ضد میکروبی گیاه به لیمو را در مهار رشد اشریشیاکلای، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و استافیلوکوکوس اورئوس در شرایط in vitro انجام دادند و احتمال دادند اثر ضد میکروبی از طریق تخریب غشای سیتوپلاسمی در باکتری ها صورت می گیرد (۱۴،۳۱). در یکی دیگر از گزارش های پژوهشی، در استان گلستان زعفرانیه و همکارانش در سال ۱۳۸۲ نشان دادند که عصاره اتانولی این گیاه در مهار رشد باکتری های مختلف به ویژه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و استافیلوکوکوس اورئوس در شرایط آزمایشگاهی اثر دارد، ولی در موش سوری تاثیر قابل توجهی در کنترل و پیشگیری از بروز عفونت جلدی ندارند(۴). در سال ۲۰۰۵ در کشور ترکیه مصطفی اوسکای و همکارانش اثر ضد میکروبی برگ های *Lippie triphylla* را بر روی ۹ عامل بیماری زایی باکتریایی و ۴ مخمر مورد مطالعه قرار دادند، یکی از این باکتری ها کلبسیلا پنومونیه بود که MIC آن ۳۰ و MBC آن ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر نشان داده شد نتیجه کلی این مطالعه این بود که فعالیت ضدمیکروبی عصاره اتانولی خام برگ ها در برابر برخی از باکتری های گرم مثبت و منفی بیماری زا و مخمرها گزارش شد و دیده شد که عصاره اتانولی برگ های تریفیلوم در برابر تمامی میکروارگانیسم های مورد آزمون به استثنای ساکارومایسز سرویزیه و *P.fluorescense* کاربرد دارد(۲۶). در سال ۲۰۰۸ Hanaa در کار پژوهشی اثر ضد میکروبی روغن برگ *lemon verbena* در مراکش مورد مطالعه قرار داد و نتیجه آن نشان داد که در محیط آزمایشگاهی دارای فعالیت در مقابل اشریشیا کلای، *P.aonginosa*، *S.aureus* است و روغن اصلی به صورت جزئی از رشد هیف های قارچی کاندیدا البیکنس و تریکودرما ممانعت می نماید. در حالی که هیچ اثر ضد قارچی در مقابل تریکودرما ویریدا مشاهده نشد(۱۷). در یک بررسی جامع گیاهان دارویی و اثرات ضد باکتریایی آن ها توسط سرینیوآسان و همکاران، ۵۰ گیاه دارویی مورد ارزیابی وسیع قرار گرفت. این محققین نشان دادند که به لیمو دارای اثر باکتری کشی بر روی طیف وسیعی از باکتری های گرم منفی و گرم مثبت می باشد(۳۶). هدف از انجام این تحقیق دست یابی به رژیم های درمانی بی خطر، با عارضه جانبی کمتر و با اثر ضد میکروبی بالاتر بر روی باکتری‌های استرپتوکوک پیوژنز، استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس، کلبسیلا پنومونیه و بروسلا ملی تنسیس است که بتواند باعث کاهش تعداد باکتری شود و بتوان در درمان، پیش گیری و ریشه کنی بیماری از آن استفاده نمود.

## مواد و روش‌ها

### نمونه گیاهی مورد استفاده

در این تحقیق از برگ های درخت به لیمو در فصل بهار از استان گلستان جمع آوری و پس از جدا کردن قسمت های زاید، کاملا" در سایه خشک و پودر آن در شیشه های درب دار مات برای مصارف بعدی نگهداری گردید.

### عصاره گیری

### تهیه ی عصاره آبی، اتانولی، استونی برگ به لیمو

۱۰۰ گرم از برگ آسیاب شده به لیمو در ۵۰۰ میلی لیتر حلال های آب مقطر، اتانول ۹۵٪(نسبت یک به پنج) و۲۰۰ گرم از پودر خشک شده را در یک لیتراستون ۱۰۰٪(نسبت ۱ به ۵) مخلوط و پس از گذشت ۲۴ ساعت

صاف گردید(۲۲). برای جدا سازی ناخالصی های موجود عصاره از سانتریفیوژ یخچال دار دور( rpm۲۵۰۰ و به مدت ۲۰ دقیقه با دمای ۴ درجه سانتی گراد) استفاده گردید. عصاره ی صاف شده با دستگاه تقطیر در خلاء میزان ۴۰ میلی لیتر تغلیظ شده و پس استریل در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد (۲۲).

**تهیه سویه های باکتری**

در این تحقیق از چهار سویه باکتری های استرپتوکوکوس پیوژن، استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس، کلبسیلاپنومونیه و بروسلا ملی تنسیس تهیه شده از بانک میکروبی مرکز تحقیقات بیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان استفاده گردید. از کلونی‌های حاصل از کشت‌های استوک باکتری های مورد مطالعه بر روی محیط مولر هینتون آگار که پس از ۲۴ ساعت رشد می‌کردند(در این حالت باکتری ها در فاز لگاریتمی رشد قرار دارند) در محیط مولر هینتون براث سوسپانسیونی تهیه و برابر ۰/۵ مک فارلند به طریقه مشاهده چشمی درمنبع نور، استاندارد شد. برای تهیه لوله‌های استاندارد مک فارلند از جدول ۱ استفاده و محلول های تهیه شده مک فارلند در لوله‌های دردار و در تاریکی تا مدت ۶ ماه قابل استفاده می‌باشند و در موقع استفاده باید لوله ها به خوبی تکان داده شوند. در کدورت ۰/۵ مک فارلند تعداد باکتری ها CFU/ml ۱۰^۸×۵/ ۱می‌باشد. کدورت باکتریایی ۰/۵ مک فارلند را به نسبت ۱:۳۰۰ رقیق گردید تا تعداد باکتری ها CFU/ml ۱۰^۵×۵ شود(۲۳).

**جدول ۱- لوله استاندارد مک فارلند**

| شماره لوله / ماده (بر حسب میلی لیتر) | ۰/۵ | ۱ | ۲ | ۳ | ۴ | ۵ | ۶ | ۷ | ۸ | ۹ | ۱۰ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| محلول کلرید باریم | ۰/۰۵ | ۰/۱ | ۰/۲ | ۰/۳ | ۰/۴ | ۰/۵ | ۰/۶ | ۰/۷ | ۰/۸ | ۰/۹ | ۱ |
| محلول اسیدسولفوریک | ۹/۹۵ | ۹/۹ | ۹/۸ | ۹/۷ | ۹/۶ | ۹/۵ | ۹/۴ | ۹/۳ | ۹/۲ | ۹/۱ | ۹ |
| دانسیته تقریبی سلولها X ۱۰^۸ در هر میلی‌لیتر | ۱/۵ | ۳ | ۶ | ۹ | ۱۲ | ۱۵ | ۰/۸ | ۲۱ | ۲۴ | ۲۷ | ۳۰ |

**بررسی اثرات ضد میکروبی به لیمو در شرایط آزمایشگاهی**

**روش انتشار چاهکی در آگار**

از سوسپانسیون میکروبی که برابر با استاندارد ۰/۵ مک فارلند بر روی آگار کشت و چاهک ها از رقت‌های ۱:۲، ۱:۴ تا ۱:۳۲ عصاره های به لیمو به مقدار ۱۰±۸۰ میکرولیتر پر گردید. پلیت ها در ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت(در مورد باکتری بروسلا ملی تنسیس پلیت ها در ۳۷ درجه سانتی گراد به همراه ۱۰-۷ درصد CO2 به مدت ۵ روز) انکوبه و در نهایت هاله عدم رشد باکتری ها بر روی پلیت در اطراف چاهک ها اندازه گیری و سه بار تکرار شد(۲۳). برای بررسی اثر ضد میکروبی رقت های مختلف انواع عصاره های به لیمو بر روی استرپتوکوکوس پیوژن، استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس، کلبسیلاپنومونیه و بروسلا ملی تنسیس، ابتدا محیط مولر هینتون آگار تهیه شد و به ضخامت ۵-۴ میلی متر در پلیت‌ها تقسیم گردید. سپس چاهک‌هایی به قطر تقریبی ۵ میلی متر در پلیت‌ها حفر شد(۲۳). لازم به ذکر است به دلیل عدم رشد باکتری استرپتوکوکوس پیوژن روی محیط مولرهینتون آگار، برای این باکتری از محیط کشت بلاد آگار استفاده گردید.

**روش ماکرودایلوشن برای تعیین MIC و MBC**

MIC در حقیقت کم ترین بازدارنده از رشد یک ماده ضد میکروبی است که اگر عامل ضد میکروبی از محیط حذف شود باکتری ها مجدداً قادر به رشد خواهند بود. MBC به حداقل غلظت ماده ضد میکروبی گفته می‌شود

که بتواند ۹۹/۹ درصد از باکتری ها را نابود کند و اگر از آن کشت ثانویه انجام دهیم کم تر از ۰/۱ درصد باکتری های اولیه رشد کنند(۲۳). برای تعیین MIC و MBC انواع عصاره های به لیمو بر روی استرپتوکوکوس پیوژن، استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس، کلبسیلاپنومونیه و بروسلا ملی تنسیس، ابتدا رقت های ۱:۲ تا ۱:۳۲ عصاره در مولر هینتون براث دوبل را تهیه و سپس با افزودن ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون میکروبی، غلظت های نهایی عصاره ۱:۲ تا ۱:۳۲ به دست آمد. لوله‌ها در ۳۷ درجه سلسیوس تا ۲۴ ساعت گرما گذاری(لوله های مربوط به بروسلا در شرایط ۷-۱۰ درصد CO2 تا ۳ روز گرما گذاری شدند). پس از ۲۴ ساعت لوله‌ها بررسی و یک ساب کالچر بر روی مولر هینتون آگار نیز داده شد. این بررسی سه بار تکرار و در کنار لوله‌های تست برای تعیین MIC و MBC عصاره های به لیمو، کنترل مثبت شامل باکتری در محیط فاقد عصاره برای مقایسه کدورت لوله‌های تست گذاشته شد(۲۳).

**بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره های برگ به لیمو بر روی باکتری های استرپتوکوکوس پیوژن، استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس، کلبسیلاپنومونیه و بروسلا ملی تنسیس در شرایط In vivo**

در این تحقیق از موش های BALB/c ماده بالغ با سن ۶-۸ هفته‌ای به وزن تقریبی ۵± ۲۵ گرم استفاده شد. موش‌ها پس از تهیه در قفس های مخصوص نگهداری حیوانات آزمایشگاهی در شرایط استاندارد تحت مراقبت قرار گرفتند. ۴۸ عدد موش ماده BALB/c را در ۴ دسته ۱۲ تایی یعنی برای هر باکتری یک دسته که شامل ۴ گروه است، تقسیم گردید. برای هر دسته عمل تزریق را جداگانه انجام داده شد. برای تهیه سوسپانسیون میکروبی جهت ایجاد عفونت در موش¬ها، از کشت ۴۸ ساعته باکتری مورد نظر، سوسپانسیون ۰/۵ مک¬فارلند که حاوی $۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ باکتری در هر میلی¬لیتر است، تهیه کرده و آن را به نسبت ۱:۳۰۰ در نرمال سالین استریل رقیق تا رقت سوسپانسیون میکروبی جهت تزریق، به تعداد $۵ \times ۱۰^{۵}$ باکتری در هر میلی¬لیتر برسد. در روز اول به هر گروه، تعداد $۵ \times ۱۰^{۵}$ CFU/mL باکتری به صورت داخل صفاقی تزریق شد. در روز بعد، ۵۰۰ میکرولیتر نرمال سالین به موش های گروه اول، ۵۰۰ میکرولیتر عصاره آبی برگ گیاه به لیمو معادل با غلظت MBC به موش های گروه دوم، ۵۰۰ میکرولیتر عصاره اتانولی برگ گیاه به لیمو معادل با غلظت MBC به گروه سوم و ۵۰۰ میکرولیتر عصاره استونی برگ گیاه به لیمو معادل با غلظت MBC به گروه چهارم به صورت داخل صفاقی تزریق گردید. پس از ۷ روز، موش¬ها با بیهوشی در دسیکاتور حاوی اتر کشته و طحال حیوانات در شرایط استریل خارج و در فسفات بافر سالین استریل به مقدار ۵ میلی لیتر هموژنیزه و از سوسپانسیون هموژنیزه طحالی، بر روی محیط مولر هینتون آگار با پورپلیت کردن کشت انجام گرفت. پلیت¬های در ۳۷ درجه سلسیوس تا ۲۴ ساعت گرما گذاری شدند (پلیت های مربوط به بروسلا در شرایط ۱۰-۷ درصد CO2 تا ۷۲ ساعت گرما گذاری شدند). پس از آن شمارش کلونی ها صورت گرفت (۱۸).

نکته: باکتری استرپتوکوکوس پیوژن قادر به رشد بر روی محیط مولر هینتون آگار نمی باشد، پس برای این باکتری از محیط بلاد آگار استفاده گردید.

**تحلیل آماری**

تمامی یافته های حاصل از این پژوهش، با آزمون آماری One Way ANOVA تست توکی با سطح احتمال$p< ۰/۰۵$ در نرم افزار آماری SPSS 18 مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند و نمودارهای مورد نیاز با نرم افزار Excell 2007 رسم گردیدند

## نتایج

**نتایج بررسی اثر ضد میکروبی عصاره ها بر روی استرپتوکوک پیوژن، استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس، کلبسیلا پنومونیه، بروسلا ملی تنسیس به روش انتشار چاهکی در آگار**

نتایج این تحقیق نشان داد که با افزایش غلظت عصاره‌های گیاهی اثر ضد میکروبی عصاره های اتانولی، استونی و آبی افزایش می یابد. بررسی ها مشخص نمود که در تمامی عصاره ها با کاهش غلظت عصاره، قطر هاله عدم رشد باکتری ها کاهش می یابد. هم چنین نتایج این مطالعه نشان داد که اثر ضد میکروبی عصاره ها در رقت-های کمتر از ۱:۸ بسیار کاهش یافته است. در انتشار چاهکی مقایسه نتایج مشخص کرد که اثر ضدمیکروبی عصاره اتانولی و استونی بسیار بیشتر از اثر ضدمیکروبی عصاره آبی است. اما در مورد باکتری کلبسیلا پنومونیه عصاره استونی در هیچ یک از رقت ها اثر ضد میکروبی نداشت و هاله عدم رشد باکتری کلبسیلا در مقابل این عصاره مشاهده نشد. استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس نیز در برابر رقت های کمتر از ۱:۲ عصاره آبی برگ گیاه به لیمو در روش انتشار چاهکی مقاومت نشان داد. در مجموع روش انتشار چاهکی مشخص نمود که باکتری کلبسیلا پنومونیه نسبت به سایر سویه های مورد مطالعه مقاومت بیشتری به عصاره های استونی، آبی واتانولی به لیمو دارد. اگرچه در رقت های خالص ۱:۲ و ۱:۴ عصاره های اتانولی و آبی هاله های عدم رشد مشاهده گردید اما در مجموع در مقایسه با سایر سویه های باکتریایی مورد مطالعه این اثر قابل ملاحظه نبود(جداول ۲ و ۳).

**جدول۲- اثر عصاره های برگ به لیمو بر روی میانگین قطر هاله های عدم رشد سویه استرپتوکوک پیوژن، استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس،**

| غلظت عصاره (mg/ml) (نسبت) | استرپتوکوکوس پیوژنز | | | استافیلوکوکوس اپی درمایس | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | قطر هاله(mm) | | | قطر هاله(mm) | | |
| | آبی | اتانولی | استونی | آبی | اتانولی | استونی |
| ۱:۱ | ۱۷ ± ۳/۶$^{a}$ | ۲۶ ± ۳/۸$^{b}$ | ۲۴ ± ۱/۳$^{b}$ | ۱۰ ± ۲/۳$^{c}$ | ۲۶ ± ۴/۷$^{b}$ | ۲۴ ± ۲/۱$^{b}$ |
| ۱:۲ | ۱۶ ± ۲/۳$^{a}$ | ۱۷ ± ۴/۵$^{a}$ | ۱۸ ± ۳/۱$^{a}$ | ۸ ± ۱/۲$^{c}$ | ۱۷ ± ۱/۸$^{a}$ | ۱۸ ± ۲/۴$^{a}$ |
| ۱:٤ | ۱۲ ± ۱/۶$^{a}$ | ۱۲ ± ۳/۳$^{a}$ | ۱۵ ± ۲/۷$^{a}$ | ۰ | ۱۲ ± ۰/۸$^{a}$ | ۱۵ ± ۱/۲$^{a}$ |
| ۱:۸ | ۶ ± ۰/۵$^{c}$ | ۱۰ ± ۳/۱$^{c}$ | ۱۲ ± ۲/۷$^{a}$ | ۰ | ۱۰ ± ۱/۶$^{c}$ | ۱۲ ± ۲/۲$^{a}$ |
| ۱:۱٦ | ۴ ± ۰/۲$^{d}$ | ۰ | ۸ ± ۱/۱$^{c}$ | ۰ | ۰ | ۸ ± ۱/۷$^{c}$ |
| ۱:۳۲ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ |

جدول ۳- اثر عصاره های برگ به لیمو بر روی میانگین قطر هاله های عدم رشد سویه کلبسیلا پنومونیه، بروسلا ملی تنسیس

| غلظت عصاره (mg/ml) | کلبسیلا پنومونیه | | | بروسلا ملی تنیس | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | قطر هاله(mm) | | | قطر هاله(mm) | | |
| | آبی | اتانولی | استونی | آبی | اتانولی | استونی |
| ۱:۱ | ۱۰ ± ۱/۳$^{c}$ | ۲۰ ± ۱/۶$^{b}$ | ۰ | ۱۴ ± ۲/۶$^{a}$ | ۲۶ ± ۴/۴$^{b}$ | ۲۴ ± ۳/۱$^{b}$ |
| ۱:۲ | ۸ ± ۰/۹$^{c}$ | ۲۴ ± ۲/۴$^{b}$ | ۰ | ۱۲ ± ۱/۳$^{a}$ | ۱۷ ± ۳/۴$^{a}$ | ۱۸ ± ۱/۷$^{a}$ |
| ۱:٤ | ۴ ± ۰/۲$^{d}$ | ۱۶ ± ۱/۱$^{a}$ | | ۱۱ ± ۰/۹$^{a}$ | ۱۲ ± ۱/۸$^{a}$ | ۱۵ ± ۲/۴$^{a}$ |
| ۱:۸ | ۰ | ۰ | ۰ | ۸ ± ۱/۵$^{c}$ | ۱۰ ± ۲/۱$^{c}$ | ۱۲ ± ۱/۷$^{a}$ |
| ۱:۱٦ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۸ ± ۰/۸$^{c}$ |
| ۱:۳۲ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ |

**نتایج تعیین MIC و MBC عصاره های برگ به لیمو بر باکتری های استرپتوکوکوس پیوژن، استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس، کلبسیلاپنومونیه و بروسلا ملی تنسیس به روش ماکرودایلوشن**

نتایج نشان داد که MIC عصاره اتانولی برگ به لیمو در محدوده ی رقت های ۱:۳۲(۲۷/۸۱میلی گرم بر میلی لیتر) تا ۱:۸ (۱۱۱/۲۵میلی گرم بر میلی لیتر) و MBC عصاره اتانولی برگ به لیمو در محدوده ی ۱:۱۶(۵۵/۶۲ میلی گرم بر میلی لیتر) تا ۱:۴(۲۲۲/۵میلی گرم بر میلی لیتر) بوده است. MIC عصاره استونی برگ به لیمو بر باکتری های مورد مطالعه در محدوده ی ۱:۱۶(۴۸/۱۸ میلی گرم بر میلی لیتر) تا ۱:۴(۱۹۲/۷۵ میلی گرم بر میلی لیتر) و MBC آن ۱:۸(۹۶/۳۷ میلی گرم بر میلی لیتر) تا ۱:۴(۱۹۲/۷۵ میلی گرم بر میلی لیتر) بوده است، هم چنین برای عصاره آبی میزان MIC در محدوده ی ۱:۸(۱۰۳/۷۵ میلی گرم بر میلی لیتر) تا ۱:۴(۲۰۷/۵ میلی گرم بر میلی لیتر) و MBC این عصاره در تمامی باکتری های مورد مطالعه رقت ۱:۴(۲۰۷/۵ میلی گرم بر میلی لیتر) است. این نتایج در جدول ۴ آورده شده اند. نتایج روش ماکرودایلوشن که جهت تعیین MIC و MBC انجام شد نشان داد که موثرترین عصاره که اثر ضد میکروبی زیادی بر روی استرپتوکوکوس پایوژنز دارد عصاره اتانولی برگ به لیمو است و عصاره آبی ضعیف ترین اثر را بر روی باکتری مذکور دارد. در مورد باکتری استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس عصاره اتانولی برگ به لیمو با غلظت ۵۵/۶۲ میلی گرم بر میلی لیتر موثرترین غلظت MIC علیه باکتری مذکور است و در مورد این باکتری عصاره باکتری غلظت بیشتری برای مهار باکتری نیاز دارد به طوری که MIC عصاره آبی برای استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس ۲۰۷/۵ میلی گرم بر میلی لیتر گزارش شد. باکتری کلبسیلا پنومونیه به عصاره اتانولی برگ به لیمو حساسیت کمتری نسبت به سایر عصاره ها نشان داد و مقایسه با سایر باکتری-ها حتی عصاره اتانولی برگ به لیمو نیز در غلظت بالاتری(۱۱۱/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر) می توانست رشد کلبسیلا پنومونیه را مهار کند. عصاره اتانولی برگ به لیمو بهترین تاثیر را روی بروسلا ملی تنسیس نشان داده است و در مورد این باکتری نیز عصاره آبی کمترین تاثیر را داشته است. در مجموع مطالعه ماکرودایلوشن در براث نشان داد که عصاره اتانولی به لیمو موثرترین عصاره علیه باکتری های مورد مطالعه است و باکتری های مورد مطالعه حساسیت کمتری به عصاره آبی دارند.

**نتایج بررسی اثر ضد میکروبی عصاره های به لیمو بر روی موش های BALB/c آلوده با باکتری های استرپتوکوک پیوژنز، استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس، کلبسیلا پنومونیه، بروسلا ملی تنسیس**

با توجه به نتایج مشخص شد که تمامی گروه های تیمار شده اختلاف معنی داری با گروه کنترل دارند. تحلیل آماری نشان داد که به ترتیب عصاره های استونی و اتانولی به لیمو در مدل حیوانی اثر ضد میکروبی بیشتری نسبت به عصاره آبی به لیمو دارند. جزئیات نتایج مدل حیوانی در جدول ۵ آورده شده است. نتایج این مطالعه نشان داد که باکتری بروسلا ملی تنسیس کمترین حساسیت و باکتری استرپتوکوکوس پیوژنز بیشترین حساسیت را به عصاره‌های اتانولی، استونی و آبی به لیمو در مدل حیوانی دارند. موثرترین عصاره علیه استرپتوکوکس پیوژنز در مدل حیوانی عصاره استونی به لیمو گزارش شد. هم چنین عصاره آبی به لیمو کمترین تاثیر را علیه استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس در مدل حیوانی داشته است. عصاره استونی به لیمو بیشترین تاثیر را علیه باکتری کلبسیلا پنومونیه داشته است و عصاره اتانولی و استونی به لیمو نسبت به لیمو نسبت به عصاره آبی تاثیر بیشتری در مدل حیوانی بر روی بروسلا ملی تنسیس نشان دادند.

**جدول ٤- تعیین حساسیت باکتری های گرم منفی و گرم مثبت به عصاره های مختلف به لیمو**

| عصاره(mg/ml) | MIC | | | MBC | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| سویه باکتری | اتانلی | استونی | آبی | اتانلی | استونی | آبی |
| کلبسیلاپنومونیه | ۱۱۱/۲ ± ۲۰/۴$^{a}$ | ۱۹۲/۷ ± ۱۹/۶$^{e}$ | ۲۰۷/۵ ± ۳۳/۸$^{e}$ | ۲۲۲/۵ ± ۲۴/۴$^{f}$ | ۱۹۲/۷ ± ۳۹/۳$^{e}$ | ۲۰۷/۵ ± ۲۷/۳$^{e}$ |
| استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس | ۵۵/۶ ± ۱۶/۱$^{b}$ | ۹۶/۳ ± ۲۰/۳$^{d}$ | ۲۰۷/۵ ± ۴۰/۳$^{e}$ | ۱۱۱/۲ ± ۴۱/۳$^{d}$ | ۱۹۲/۷ ± ۳۲/۶$^{e}$ | ۲۰۷/۵ ± ۱۶/۹$^{e}$ |
| استرپتوکوکوس پیوژن | ۲۷/۸ ± ۴/۳$^{c}$ | ۴۸/۱۸ ± ۱۰/۲$^{b}$ | ۱۰۳/۷ ± ۴۹/۷$^{a}$ | ۵۵/۶ ± ۸/۳$^{b}$ | ۹۶/۳ ± ۲۷/۵$^{d}$ | ۲۰۷/۵ ± ۳۳/۳$^{e}$ |
| بروسلا ملی تنسیس | ۵۵/۶ ± ۱۱/۶$^{b}$ | ۹۶/۳ ± ۱۸/۳$^{d}$ | ۲۰۷/۵ ± ۳۲/۸$^{e}$ | ۱۱۱/۲ ± ۱۶/۱$^{d}$ | ۱۹۲/۷ ± ۶۰/۲$^{e}$ | ۲۰۷/۵ ± ۴۳/۱$^{e}$ |

اطلاعات بر مبنای میانگین±انحراف معیار بوده و حروف غیر همنام نشان دهند تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.

**جدول۵- اثر عصاره های به لیمو بر روی میانگین تعداد بر روی تعداد باکتری های رشد یافته در طحال موش های آلوده**

| سویه باکتری / نوع ماده | استرپتوکوکس پیوژنز | استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس | کلبسیلا پنومونیه | بروسلا ملی تنسیس |
|---|---|---|---|---|
| آبی | ۷×۱۰$^{۴\ a}$ | ۶/۳×۱۰$^{۶b}$ | ۲×۱۰$^{۶b}$ | ۸/۶×۱۰$^{۸c}$ |
| اتانولی | ۹/۴×۱۰$^{۳e}$ | ۳×۱۰$^{۴a}$ | ۵×۱۰$^{۵f}$ | ۸×۱۰$^{۷g}$ |
| استونی | ۸/۸×۱۰$^{۳e}$ | ۳×۱۰$^{۴a}$ | ۶/۸×۱۰$^{۴a}$ | ۶×۱۰$^{۷g}$ |
| کنترل(نرمال سالین) | ۷×۱۰$^{۹h}$ | ۲×۱۰$^{۱۰i}$ | ۵×۱۰$^{۱۰i}$ | ۹×۱۰$^{۱۴j}$ |

اطلاعات بر مبنای میانگین±انحراف معیار بوده و حروف غیر همنام نشان دهند تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.

## بحث و نتیجه گیری

در سال ۲۰۰۸ Hanaa در قالب یک کار پژوهشی، اثر ضد میکروبی روغن برگ *Lemon verbena* را در مراکش مورد مطالعه قرار داد و نتایج آن نشان داد که در محیط آزمایشگاهی این روغن دارای فعالیت ضد میکروبی در مقابل اشریشیا کلای، سودوموناس آئروژینوز، استافیلوکوکوس اورئوس است و روغن اصلی به صورت جزئی از رشد هیف های قارچی کاندیدا البیکنس و تریکودرما ممانعت می نماید. در حالی که هیچ اثر ضد قارچی در مقابل تریکودرما ویریدا مشاهده نکرد که نتایج اثر ضد باکتریایی روغن این گیاه با عصاره های مورد مطالعه در بررسی حاضر بر روی باکتری های

استرپتوکوکوس پایوژنز، استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس، بروسلا ملی تنسیس همخوانی دارد ولی با نتایج آن ها با اثر عصاره های مورد مطالعه ما بر روی کلبسیلا پنومونیه نزدیکی چندانی ندارد(۱۷). در مطالعه ای که توسط Cowan در سال ۱۹۹۹و Sartoratto در سال ۲۰۰۴ به همراه همکارانشان انجام شد، اثر ضد میکروبی گیاه به لیمو را در مهار رشد اشریشیاکلای، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و استافیلوکوکوس اورئوس در شرایط in vitro با روش انتشار چاهکی در آگار انجام دادند و دریافتند عصاره های این گیاه بر روی باکتری های مورد مطالعه اثر ضد میکروبی دارند که با نتایج حاصل از مطالعه حاضر مطابقت دارد(۳۱). آن ها هم چنین احتمال دادند اثر ضد میکروبی از طریق تخریب غشای سیتوپلاسمی در باکتری ها صورت می گیرد اما مکانیسم اثر عصاره ها در مطالعه حاضر مورد بررسی قرار نگرفته است(۲۸،۳۱). در یکی دیگر از کارهای پژوهشی، در استان گلستان زعفرانیه و همکارانش در سال ۱۳۸۲ نشان دادند که عصاره اتانولی برگ گیاه به لیمو باعث مهار رشد باکتری های مختلف به ویژه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و استافیلوکوکوس اورئوس در شرایط آزمایشگاهی می شود، که با نتایج مطالعه فعلی هم خوانی دارد ولی آن ها در موش سوری تاثیر قابل توجهی در کنترل و پیشگیری از بروز عفونت جلدی گزارش نکردند(۴). در مطالعه ای اثر ضد میکروبی عصاره های میوه و دانه به را بر باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس و سودوموناس آئروژینوزا مورد مطالعه قرار دادند و دریافتند که گیاه به می تواند اثر مهاری بر روی باکتری های مورد مطالعه داشته باشد اما مقایسه نتایج مطالعه حاضر با نتایج ان ها نشان می دهد که اثر ضد میکروبی عصاره های گیاه به لیمو بیشتر از اثر عصاره های میوه و دانه به بوده است(۲). oskay و همکارانش اثر ضد میکروبی برگ های *Lippie triphylla* را بر روی ۹ عامل بیماری زایی باکتریایی و ۴ نوع مخمر مورد مطالعه قرار دادند، یکی از این باکتری ها کلبسیلا پنومونیه بود که MIC آن ۳۰ و MBC آن ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر نشان داده شد نتیجه کلی این مطالعه این بود که فعالیت ضدمیکروبی عصاره اتانولی خام برگ ها در برابر برخی از باکتری های گرم مثبت و منفی بیماری زا و مخمرها گزارش شد و دیده شد که عصاره اتانولی برگ های تریفیلوم در برابر تمامی میکروارگانیسم های مورد آزمون به استثنای *S.cerevisiao* و *P.fluorescense* کاربرد دارد که در مقایسه با اثر عصاره‌های به لیمو مورد مطالعه در پژوهش ما میزان MIC و MBC گیاه آن ها بسیار پایین تر بوده که نشان می دهد تاثیر عصاره آن ها علیه باکتری کلبسیلا پنومونیه بهتر از عصاره گیاه در این مورد مطالعه است(۲۶).

در مجموع نتایج این بررسی نشان داد که عصاره های آبی، اتانولی و استونی استخراج شده از گیاه دارویی به لیمو در شرایط In vitro و In vivo دارای فعالیت ضد میکروبی و باکتری کشی علیه باکتری های استرپتوکوک پیوژن، استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس، کلبسیلا پنومونیه و بروسلا ملی تنسیس می باشند.

## منابع


**۱**–حسنی طباطبایی، ع.، فیروزی، ر.۱۳۸۴. بیماری های باکتریایی دام، انتشارات دانشگاه تهران ،چاپ دوم، صفحات: ۳۰۳-۳۲۵.

**۲**–خلیقی سیگارودی، ف.، تقی زاده، م.، جاروندی، ص. ۱۳۸۴. راهنمای تداخلات گیاهان دارویی با داروهای شیمیایی، چاپ اول، جهاد دانشگاهی واحد شهید بهشتی، تهران، صفحه ۳۴.

**۳**–دلنواز هاشملویان، بابک. ۱۳۸۶. خواص دارویی و خوراکی گیاهان. ساوه: انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی. صفحات ۱۸۰-۱۰۰.

۴-زعفرانیه، ز. ۱۳۹۸. بررسی اثر بخشی عصاره گیاه شیرین بیان و به لیمو برروی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس. دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان. پایان نامه دوره کارشناسی ارشد.

۵-عنایت زاده میمندی، س. ا. ۱۳۸۴ بررسی اثر گیاه مریم نخودی با (*Teucrium polium* ) و نام محلی (جزکوهی) روی باکتری بروسلا آبورتوس. پایان نامه دکتری دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد.

٦-کیانمهر، ه.۱۳۸۷. شناخت گیاهان دارویی. تهران: انتشارات آییژ. صفحات ۲۵۶-۲۰۰.

۷-قائمی، ع.، خورشیدی، د.، مرادی، ع.، سیفی، ا.، مازندرانی، م.، بازوری، م. ۱۳۸۵. تاثیر عصاره برگ گیاه به لیمو بر زخم های ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس در مدل حیوانی. فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران. جلد۲۲، شماره ۳، صفحه ۲۴۲-۲۴۹.

**8.**Amaya, M., Tajima, M., Okubo, Y., Sugita, T., Nishikawa, A., Tsuboi, R. (2007). Molecular analysis of *Malassezia microflora* in the lesional skin of psoriasis patients. J Dermatol, 34(9); 619-24**.**

**9.**Argyropoulou, CC., Daferera, D., Tarantilis, PA. (2007). Chemical composition of the essential oilfrom leaves of *Lippia citriodora* H.B.K. (Verbenaceae) at two developmental stages. Plant Geno.Evol, 35; 831–7.

**10.**Balunas, MJ., Kinghorn, AD. (2005). Drug discovery from medicinal plants. Life Sci, 78(5); 431-41.

**11.**Carcas, L. (2014). Gastric cancer review. J Carcinog, 13;14-23.

**12.**Cragg, GM., Newman, DJ. (2005). Plants as a source of anti-cancer agents. J Ethnopharmacol, 22;72-79.

**13.**Chen, L., Mathema, B., Chavda, KD., DeLeo, FR., Bonomo, RA., Kreiswirth, BN. (2014). Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: molecular and genetic decoding. Trends Microbial, 22(12); 686-96.

**14.**Cowan, M.M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. Clinical Microbiology Reviews, 12(4); 564-582 .

**15.**Funes, L., Carrera-Quintanar, L., Cerdán Calero, M., Ferrer, MD. (2011).Effect of *Lemon verbena* supplementation on muscular damagemarkers, proinflammatory cytokines releaseand neutrophils' oxidative stress in chronic exercise. Eur J Appl Physiol, 111(4); 695-705.

**16.**Gleiser, RM., Zygadlo, JA. (2007). Insecticidal properties of essential oils from *Lippia turbinata* and *Lippia polystachya* (Verbenaceae) against *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). Parasitol Res, 5; 1349-54.

**17.**Hanaa, F.M., Hossam, A., EL-Beltagi, S., Nasr, N.F. (2008). Assessment of volatile components,free radical-scavenging capacity and anti-microbial activity of *Lemon verbena* leaves. Research Journal, 2(2);84-92.

**18.**Jinkyung, K., Splitter, GA. (2003). Molecular host – pathogen interaction in Brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. Cli Mic Rev, 16(1); 65-78.

**19.**Kim, NS., Lee, DS. (2004). Headspace solid-phase microextraction for characterization of fragrances of *Lemon verbena* (*Aloysia triphylla*) by gas chromatography-mass spectrometry. J Sep Sci, 1-2; 96-100.

**20.**Lasagni Vitar, RM., Reides, CG., Ferreira, SM., Llesuy, SF. (2014). The protective effect of *Aloysia triphylla* aqueous extracts against brain lipid-peroxidation. Food Funct, 5(3); 557-563.

**21.**Melo, JO., Fachin, AL., Rizo, WF., Jesus, HC., Arrigoni-Blank, MF., Alves, PB. (2014). Cytotoxic effects of essential oils from three *Lippia gracilis* Schauer. genotypes on HeLa, B16, and MCF-7 cells and normal human fibroblasts. Genet Mol Res, 13(2); 2691-7.

**22.**Mirzaie, A., Shandiz, S., Ataollah, S., Noorbazargan, H. (2016). Evaluation of chemical composition, antioxidant, antibacterial,cytotoxic and apoptotic effects of *Aloysia citrodora* extract on colon cancer cell line.Tehran University Medical Journal, 74(3); 168-176.

**23.**Mohsen nezhad, F. (2009). Antibacerial activity of Eukalyptus extracts on methicillin resistance *Staphylococcus aureus*. Research Journal of Biological Sciences, 4(8); 905-908

**24.**Mothana, RA., Abdo, SA., Hasson, S., Althawab, FM., Alaghbari, SA., Lindequist, U. (2010). Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities and phytochemical screening of some yemeni medicinal plants. Evid Based Complement Alternat Med, 7(3);323-30.

**25.**Mukherjee, AK., Basu, S., Sarkar, N., Ghosh, AC. (2001). Advances in cancer therapy with plant based natural products. Curr Med Chem, 8(12);1467-86.

**26.**Mustafa Oskay, A., Usame, T.,Gungor, AY., Dilek, S., kamuran, A. (2005). Antimicrobial activity of the leaves of *Lippie triphylla* O.Kuntze(verbenaceae) against on bacteria and yeasts, Journal of Biological Sciences, 5(5); 620-622.

**27.**Pascual, ME., Slowing, K., Carretero, E., Sanchez, MD., Villar, A. (2001). *Lippia: traditional* uses, chemistry and pharmacology. J Eth-nopharmacology, 76(3); 201-14.

**28.**Pinto Cda, P., Rodrigues, VD., Pinto, Fda P., Pinto Rda, P., Uetanabaro, AP., Pinheiro, CS. (2013). Antimicrobial activity of *Lippia* species from the brazilian semiarid region traditionally used as antiseptic and anti-infective agents. Evid Based Complement Alternat Med, 2013; 614501.

**29.**Portmann, E., Nigro, MM., Reides, CG., Llesuy, S., Ricco, RA., Wagner, ML. (2012). Aqueous extracts of *Lippia turbinata* and *Aloysia citriodora* (Verbenaceae): assessment of antioxidant capacity and DNA damage. Int J Toxicol, 2; 192-202.

**30.**Quirantes-Piné, R., Herranz-López, M., Funes, L., Borrás-Linares, I., Micol, V., Segura-Carretero, A. (2013). Phenyl propanoids and their metabolites are the major compounds responsible for blood-cell protection against oxidative stress after administration of *Lippia citriodora* in rats. Phytomedicine, 12; 1112-8.

**31.**Sartoratto, A., Machado, A.M., Delarmelina, C., Figueira, G.M., Duarte, M.T., Rehder, G. (2004). Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. Brazilian Journal of Microbiology, 35(4); 54-59.

**32.**Shafiee, F., Moghadamnia, A., Shahandeh, Z.,Sadighian, F. (2016). Evaluation of the antibacterial effects of aqueous and ethanolic leaf extracts of *Aloysia citriodora* (*Lemon verbena*) on *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. Electron Physician, 8(12); 3363-3368.

**33.**Shahhoseini, H., Ghorbani, H., Saleh, R., Omidbaigi, R. (2012). Identification of essential oil content and composition of *Lippia citriodora* seed. J Plant Production, 18(4); 91-6.

**34.**Shen, H., Tang, G., Zeng, G., Yang, Y., Cai, X., Li, D. (2013). Purification and characterization of an antitumor polysaccharide from *Portulaca oleracea*. CarbohydratePolymers, 93(2); 395-400.

**35.**Spector Platt, E. (2002). Lemon Herbs: How to grow and use 18 great plants, Stackpol Books. USA. p. 35.

**36.**Srinivasan, D., Nathan, S., Suresh, T., Lakshmana Perumalsamy, P. (2001). Antimicrobial activity of certain Indian medicinal plants used in folkloric medicine. J Ethnopharmacol, 74; 217–220.

**37.**Stashenko, EE., Martínez, JR., Ruíz, CA., Arias, G., Durán, C., Salgar, W. (2010). *Lippia origanoides* chemotype differentiation based on es-sential oil GC-MS and principal component analysis. J Sep Sci, 33(1); 93-103.

**38.**Valentão, P., Fernandes, E., Carvalho, F., Andrade, PB., Seabra, RM., de Lourdes Basto, M. (2002). Studies on the antioxidant activity of *Lippia citriodora* infusion: scavenging effect on superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid. Biol Pharm Bull, 10; 1324–7.

**39.**Vanajothi, R., Sudha, A., Manikandan, R., Rameshthangam, P., Srini-vasan, P. (2012). *Luffa acutangula* and *Lippia nodiflora* leaf extract induces growth inhibitory effect through induction of apoptosis on human lung cancer cell line. Biomed Prev Nutr, 2(4); 287-93.

**40.**Vuorelaa, P., Leinonenb, M., Saikkuc, P., Tammelaa, P., Rauhad, JP., Wennberge, T. (2004). Natural products in the process of finding new drug candidates. Curr Med Chem, 11;1375-89.

# Evaluation of the Antimicrobial Effect of *Lemon verbena* leaves Extracts on *Streptococcus pyogenes, Staphylococcus epidermidis, Klebsiella pneumoniae* and *Brucella melitensis* in vitro and Animal Model Study

Sh. Nassiri Semnani[1], **N. Ghassempoor[2]**

**1.**Assistant Professor in Department of Microbiology, Factualty of Bacic Sciences -Engineering, Zanjan Branch, Islamic Azad university, zanjan.Iran.

**2.**PhD. student General Veterianary, Factualty of Veterianary Razi University, Kermanshah. Iran.

**ng.nastaranghassempoor2060@gmail.com**

**Received:2020.22. 7** **Accepted: 2020.20.9**

## Abstract

**Inroduction & Objective: Streptococcus pyogenes and Staphylococcus epidermidis Klebsiella pnenmonia and Brucella melitensis have high resistance to antibiotics treatments. The aim of this study, was to investigate the antimicrobial effect of Lemon verbena leaves extracts on Streptococcus pyogenes, Staphylococcus epidermidis, Klebsiella pneumoniae and Brucella melitensis in vitro and animal model study.**

**Material and Method: In this studies after prepagation, of extracts Lemon leaves MIC and MBC and diameter of inhibition zone was determined by well diffusion agar method, the extracts on bacteria determined by broth dilution method. In animal model study, 5×105 CFU/ml bacteria were injected intraperitioneally in to mice and the counts of bacterias colonies was countected according to the standard protocol.**

**Results: The results of macrodilution method showed that the MIC of ethanolic extract of the leaves of the lemon verbena in the range of 1:32 dilution (27.81 mg/ml) to 1:8 (111.25 mg/ml) and MBC ethanolic extract of the leaves of the lemon verbena in the range 1:16 (55.62 mg/ml) to 1:4 (222.5 mg/ml). MIC of acetonic extract of the leaves of the lemon verbena in the range of 1:32 dilution (27.81 mg/ml) to 1:8 (111.25 mg/ml) and MBC of acetonic extract of the leaves of the lemon verbena in the range 1:16 (48.18 mg/ml) to 1:4 (192.75 mg/ml). Also MIC of aqueous extract was in the range of 1:8 (103.75 mg/ml) to 1:4 (207.5 mg/ml) and MBC of this extract was in 1:4 dilutions (207.5 mg ml) in all studied bacteria. In animal model, were seen a significant reduction between the treated groups with control group. Ethanolic and acetonic extract *Lemon verbena* more effective in an animal model.**

**Conclusion: The results of this study showed that *Lemon verbena* extracts has antimicrobial effect on studied bacteria**

**Keywords:** *B. subtilis*, Growth, hematological parameters, intestine tissue, *Oncorhynchos mykiss*.